

# Resposta metabólica e genética de *Vitis Vinifera* cv. Loureiro infetada com Flavescência Dourada e potencial do metil jasmonato na indução de mecanismos de defesa

Inês de Castro Moreira Coelho de Lemos

Mestrado em Engenharia Agronómica  
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território  
2017

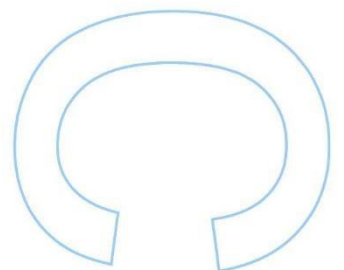
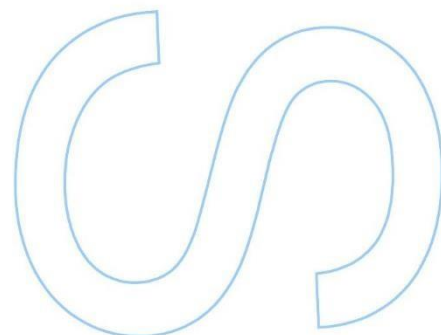
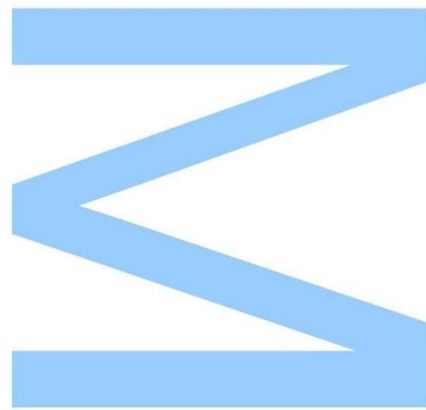
## **Orientador**

Susana M.P. Carvalho, Professora Auxiliar,  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Coorientador**

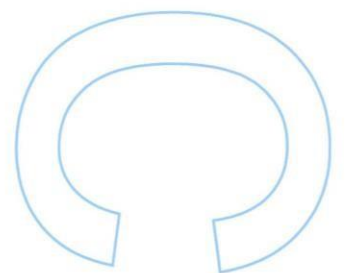
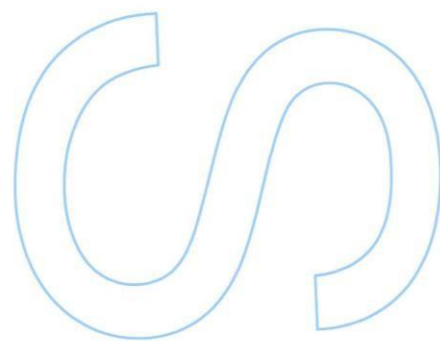
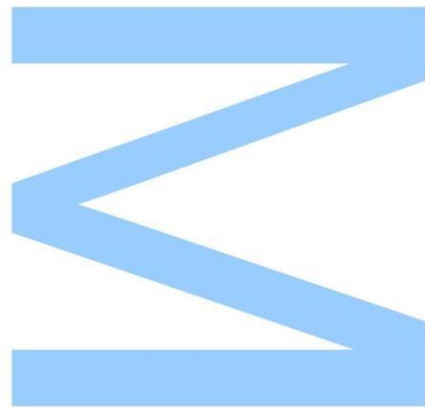
Marta Vasconcelos, Investigadora,  
Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Manuel Oliveira, PhD Student,  
Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto



Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.  
O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



# Agradecimentos

No final de mais uma etapa da minha vida, gostaria de expressar o meu sincero reconhecimento a todas as pessoas que contribuíram diretamente para a concretização deste trabalho:

À Professora Doutora Susana Carvalho, agradeço desde já por ter aceite ser minha orientadora, pelo voto de confiança e por se demonstrar sempre otimista perante as adversidades que surgiram ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Marta Vasconcelos, agradeço por ter aceite ser minha coorientadora, pela partilha de conhecimentos e pelo espírito científico que me inculuiu.

Ao Mestre Manuel Oliveira, quero agradecer pela disponibilidade, por toda ajuda na execução do trabalho laboratorial, e pelos os momentos de *brainstroming* vivenciados no decorrer deste trabalho.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

À Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

À Doutora Carla Santos, o apoio e força transmitidos na reta final deste trabalho.

Ao grupo Plantech, pela forma acolhedora como me receberam e pelo espírito de grupo que me transmitiram ao longo destes meses. Agradeço em especial à Martinha e a Ana, por todos os conselhos prestados durante a execução do trabalho prático.

À minha família e aos meus amigos, pelo amor, apoio incondicional e paciência transmitidos ao longo desta jornada.

# Resumo

A Flavescência dourada é uma doença epidémica da vinha, associada a grandes perdas de produção, ao decréscimo da qualidade da uva e à morte das cepas mais suscetíveis. A infeção da Flavescência é provocada por um fitoplasma, que é transmitido de forma epidémica pelo cicadélídeo *Scaphoideus titanus* Ball. Atualmente, as medidas vigentes para o controlo desta doença têm demonstrado ser ineficazes, visto que continuam a ser relatados novos casos na Europa. Este estudo teve como objetivos gerais: (i) comparar um conjunto de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas saudáveis e infetadas com Flavescência dourada; (ii) e avaliar o efeito indutor do metil jasmonato nos mecanismos de defesa da videira contra Flavescência Dourada. Neste sentido, com a cultivar Loureiro foi feita a análise fisiológica e bioquímica e, ainda a genética; nas duas primeiras, avaliou-se o efeito do metil jasmonato (12,5 e 25 mM) em videiras saudáveis e infetadas. O estudo genético focou-se na avaliação da expressão de genes codificantes de proteínas relacionadas com a patogenicidade, genes envolvidos na obtenção de energia e degradação de proteínas e genes da via dos fenilpropanoides.

Neste estudo, verificou-se que o tratamento com 12,5 mM de metil jasmonato induziu a produção de saponinas em plantas infetadas. Em contrapartida, verificou-se que a aplicação de metil jasmonato induziu positivamente a síntese de prolina apenas em plantas saudáveis. Em relação à expressão de genes, verificou-se que houve um maior número de genes expressos 24h após aplicação de 12,5 mM de metil jasmonato em plantas infetadas pré-elicítadas, e 24h depois do tratamento com 25 mM de metil jasmonato em plantas infetadas elicítadas apenas ao pintor.

Palavras-chave: Flavescência dourada, metil jasmonato, metabolitos, genes.

# Abstract

Flavescence Dorée is an epidemic disease of the grapevine, associated with large production losses, lower grape quality and death of the most susceptible cultivars. Flavescence infection is caused by a phytoplasma, which is spread epidemically by the *Scaphoideus titanus* Ball. Currently, existing measures for the control of this disease have been shown to be ineffective as new cases continue to be reported in Europe.

This study had two general objectives: (i) to compare a set of physiological, biochemical and molecular parameters in healthy and infected plants; (ii) and to evaluate the effect of methyl jasmonate on the induction of defense mechanisms of grapevines against Flavescence Dorée. Thus, with a cultivar “Loureiro” was made a physiological and biochemical analysis, and a genetic assay; in the first two analysis, was evaluated the effect of methyl jasmonate (12,5 and 25 mM) on healthy and infected vines. Genetic assay was focused on the evaluation of gene expression of genes encoding pathogenicity-related proteins, involved in energy production and protein degradation and genes of the phenylpropanoid pathway.

In this study, 12,5 mM of methyl jasmonate treatment was shown an induction of saponins production in infected plants. In contrast, methyl jasmonate application showed a positively induction of proline synthesis, only in healthy plants. Regarding gene expression, it was found that 12,5 mM of methyl jasmonate induced a greater number of expressed genes 24 hours after application, in pre-elicited infected plants, and 24 hours after treatment with 25 mM of methyl jasmonate on infected plants, elicited only in veraison.

Keywords: Flavescence dorée, methyl jasmonate, metabolites, genes.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>x</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>3</b>
2.1. Região Demarcada dos Vinhos Verdes .....	3
2.1.1. Casta Loureiro .....	4
2.2. Fitoplasmas.....	5
2.2.1. Fitoplasma da Flavescência Dourada.....	6
2.3. Inseto vetor .....	7
2.3.1. Ciclo de vida .....	7
2.3.2. Interação inseto vetor-fitoplasma .....	8
2.4. Sintomas da Flavescência Dourada.....	9
2.5. Métodos de deteção .....	11
2.6. Métodos de combate .....	12
2.6.1. Métodos convencionais .....	12
2.6.2. Novas perspetivas na gestão da Flavescência Dourada .....	13
2.6.2.1. Uso de espécies Vitis e cultivares V. vinifera naturalmente resistentes à FD .....	13
2.6.2.2. Utilização dos endófitos como ferramenta sustentável de bio controlo da FD .....	14
2.6.2.3. Gestão integrada do inseto vetor .....	15
2.6.2.4. Modelos preditivos.....	16
2.7. Uso de elicitadores .....	16
2.7.1. Interação elicitador-planta .....	17
2.7.2. Ácido Salicílico.....	17
2.7.3. Etileno .....	17

2.7.4.	Metil Jasmonato.....	18
2.8.	Metabolitos de defesa.....	18
2.8.1.	Saponinas .....	19
2.8.2.	Prolina .....	20
2.8.3.	Lenhina .....	21
2.8.4.	Fenólicos e Flavonóides .....	21
2.9.	Estudos Genéticos em plantas infetadas com Flavescência Dourada .....	23
<b>3.</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>24</b>
3.1.	Localização do Ensaio.....	24
3.2.	Condições Experimentais .....	24
3.3.	Metodologia Analítica.....	26
3.3.1.	Quantificação do Conteúdo em Água .....	26
3.3.2.	Peroxidação Lipídica .....	26
3.3.3.	Quantificação de Pigmentos Foliares .....	27
3.3.4.	Quantificação de Saponinas .....	27
3.3.5.	Quantificação de Prolina .....	27
3.3.6.	Quantificação de Lenhina .....	28
3.3.7.	Quantificação de Compostos Fenólicos Totais.....	28
3.3.8.	Quantificação de Flavonóides .....	29
3.4.	Solução de Metil Jasmonato (MeJA).....	29
3.5.	Expressão de Genes .....	29
3.5.1.	Extração de RNA .....	29
3.5.2.	Síntese de cDNA/ Diluição de cDNA .....	30
3.5.3.	PCR quantitativo (qPCR).....	30
3.5.4.	Primers para o estudo de expressão de genes .....	30
3.6.	Análise Estatística.....	32
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Análise Fisiológica e Bioquímica.....	33
4.1.1.	Conteúdo em Água .....	33
4.1.2.	Peroxidação Lipídica.....	34

4.1.3. Pigmentos Foliares.....	35
4.1.4. Saponinas.....	37
4.1.5. Prolina.....	37
4.1.6. Lenhina.....	38
4.1.7. Compostos Fenólicos Totais.....	39
4.1.8. Flavonóides.....	40
4.2. Análise da Expressão de Genes.....	41
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>44</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>62</b>



# Lista de Tabelas

Tabela 1- Distribuição da Flavescência Dourada. Adaptada de CABI (2017). .....	7
Tabela 2- Primers para os genes envolvidos na síntese proteínas relacionadas com patogenicidade (PR) .....	31
Tabela 3- Primers para os genes envolvidos em processos de obtenção de energia e de degradação de proteínas .....	31
Tabela 4- Primers para os genes envolvidos na via dos fenilpropanoides .....	31

# Lista de figuras

Figura 1- Região Demarcada do Vinho Verde. Adaptada de Oliveira (2000). .....	4
Figura 2- Ciclo de vida de <i>Scaphoideus titanus</i> . As datas são indicativas e variáveis conforme o ano e a localização. Retirado de Chucho e Thiéry (2014). .....	8
Figura 3- Sintomas da Flavescência Dourada nos cachos (A); em folhas de casta em folhas de castas brancas (B); e em castas tintas (C); Disposição em forma de “telha” (D). .....	11
Figura 4- Técnica das pancadas, método de recolha (A); ninfas capturadas (B). Retirado de Andrade et al. (2015). .....	13
Figura 5- Saponinas glicoalcaloides (A); triterpenóides (B). Adaptada de Golawska (2007). .....	20
Figura 6-Vista aérea da Quinta do Corvo e do local de amostragem. Retirado de Google Earth (2017) .....	24
Figura 7- Representação esquemática de aplicação dos tratamentos para as análises fisiológicas e bioquímicas (objetivo 1) (A); e genéticas (objetivo 2) (B). .....	26
Figura 8 - Sintomatologia presente no momento da amostragem: alteração da pigmentação das folhas (A); aborto dos cachos (B). .....	33
Figura 9- Percentagem de conteúdo em água em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas $\pm$ EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). .....	34
Figura 10- Concentração de MDA em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas $\pm$ EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). .....	35
Figura 11- Concentração de clorofilas totais (A), carotenóides (B) e antocianinas (C) em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas $\pm$ EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). .....	36
Figura 12- Concentração de saponinas em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas $\pm$ EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). .....	37

- Figura 13- Concentração de prolina em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ )..... 38
- Figura 14 - Concentração de lenhina em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ )..... 39
- Figura 15- Concentração de compostos fenólicos em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). ..... 40
- Figura 16- Concentração de flavonóides totais em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). ..... 40
- Figura 17- Heat map, obtido por RT-PCR, referente à expressão de genes após aplicação de 0 (solvente), 12,5 e 25 mM de MeJA, uma semana antes da floração, e uma re-aplicação ao pintor; 25 MeJA P, tratamento exclusivo ao pintor com 25 mM de MeJA. A recolha das amostras foi efetuada antes da aplicação (T0), 6h e 24h após a aplicação, (T6) e (T24) respetivamente. (verde, menor expressão, vermelho, maior expressão). Os resultados expressos foram calculados através do rácio FD+/FD-..... 41

# Lista de Abreviaturas

- CIA- Clorofórmio/álcool isoamílico
- CHIT4c- *Acidic class IV chitinase*
- CTAB- *Cetyl trimethylammonium bromide*
- CVRV- Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
- DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária
- FD- Flavescência Dourada
- EP- Erro padrão
- GLU-  $\beta$ -1,3-glucanase
- MDA- Malondialdeído
- MeJA- Metil Jasmonato
- MLOs- *Mycoplasma-like organisms*
- PAL- *Phenylalanine ammonia lyase*
- PBSP- *Plant Secretory Secret protein*
- PCR- *Polymerase chain reaction*
- PGIP- *Polygalacturonase-inhibiting protein*
- PIN- *Inhibitors of serine proteases*
- Prot.  $\alpha$ 5- *Proteasome  $\alpha$ 5 subunit*
- Osmot- *Osmotin like protein*
- Rusbisco- *Rubisco activase AAA+*
- STE- *Sodium Chloride-Tris-EDTA*
- S. titanus- *Scaphoideus titanus*
- STS- *Stilbene synthase*
- Thau I- *Thaumatococcus I*
- Thau II- *Thaumatococcus II*

# 1. Introdução

As doenças resultantes da infecção por fitoplasmas encontram-se dispersas por todo o mundo, estando na sua maioria associadas a surtos epidêmicos graves e à destruição total de culturas (Bertaccini & Duduck, 2009). Neste contexto, destacam-se as *Grapevine Yellows* que têm sido amplamente reportadas como uma das maiores ameaças ao setor vitivinícola europeu, sendo a Flavescência Dourada (FD) considerada a doença mais importante deste grupo, seguida da Bois Noir (Belli et al., 2010).

A FD é uma doença exclusiva do gênero *Vitis* provocada pelo fitoplasma *Flavescence doreé phytoplasma* (Angelini et al., 2001). Esta é transmitida a curtas distâncias de forma epidêmica pelo cicadelídeo *Scaphoideus titanus* Ball, e a longas distâncias através de material de propagação vegetativo infetado (Chuche & Thiéry, 2014). As plantas infetadas com FD apresentam um conjunto de sintomas específicos tais como o amarelecimento ou o avermelhamento das nervuras principais e das folhas, consoante a casta, o encurtamento dos entre-nós, o enrolamento das folhas, o aborto das inflorescências e a lenhificação anormal dos pâmpanos (Vitali et al., 2013; Margaria & Palmano, 2011). Contudo, apesar da sintomatologia da FD estar amplamente descrita na bibliografia, uma parte dos processos que integram as relações eco fisiológicas entre fitoplasma e videira ainda não foram esclarecidos pela comunidade científica.

Porém, nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários estudos no sentido de esclarecer o efeito da FD em videira. Destes destacam-se a o estudo da expressão genética na monitorização da infecção por FD (Margaria & Palmano, 2011), a influência da FD na via dos flavonóides (Margaria et al., 2014) ou a diminuição da atividade fotossintética em plantas infetadas (Vitali et al., 2013). No entanto, ainda existem relativamente poucos trabalhos que descrevam a influência da FD na resposta genética e metabólica da videira. Por outro lado, o prejuízo económico associado à FD, consequência tanto da diminuição da produtividade e da qualidade da uva, como da morte das cepas mais suscetíveis, exige o desenvolvimento de um tratamento eficaz contra o fitoplasma. Isto porque, até ao presente momento, o controlo da disseminação da FD limita-se exclusivamente à adoção de medidas preventivas como a erradicação das videiras infetadas e a queima da lenha de poda, o tratamento com inseticidas contra o inseto vetor, e a utilização de material de propagação certificado. As medidas vigentes contra a doença apresentam impactos económicos e ecológicos óbvios, uma vez que, por exemplo, o tratamento com inseticidas em vinhas é incompatível com o modo de produção biológico (Marzorati et al., 2006). Assim, considerando as atuais preocupações sobre a saúde, a segurança alimentar e o impacto ambiental que implicam a diminuição do uso de pesticidas na agricultura (Belhadj et al., 2008), surge

a necessidade de desenvolver estratégias alternativas para a erradicação de agentes patogénicos, tais como os fitoplasmas.

Desta forma, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de estudar a utilização de elicitadores, tal como o Metil Jasmonato (MeJA), na indução dos mecanismos de defesa naturais das plantas. A aplicação exógena de MeJA em células de videira ou de uva tem revelado resultados positivos quer na indução da expressão de proteínas de defesa, de estilbenos e de antocianinas (Belhadj et al., 2006; Belhadj et al., 2008; Martinez-Esteso et al., 2009), quer no aumento do conteúdo de compostos fenólicos (Ruiz-García, 2012), ou ainda na promoção da eficiência fotoquímica (Bidabadi et al., 2013).

Com o presente trabalho procura-se avaliar a eficiência do elicitador MeJA na indução da resposta metabólica e genética de *Vitis vinifera* cv. Loureiro infetada com fitoplasma da FD. Este integra um conjunto de sub tópicos nomeadamente: (i) Analisar a resposta de defesa da videira quando infetada com o fitoplasma da FD, através : da quantificação de pigmentos foliares; produção de metabolitos de defesa, tais como, prolina, saponinas, lenhina, fenólicos e flavonóides; e da análise fisiológica, nomeadamente conteúdo em água e dano oxidativo; (ii) Seleção de genes que, codificam proteínas PR, estão envolvidos em processos de obtenção de energia, como a fotossíntese, de degradação de proteínas e que codificam enzimas envolvidas na via dos fenilpropanóides; (iii) Avaliar a expressão de genes e relacionar com a infeção do fitoplasma da FD; (iv) Determinar a concentração de MeJA que despoleta a melhor resposta metabólica e genética, bem como analisar o tempo de aplicação do elicitador que induz o perfil de expressão do maior número de genes de interesse. A casta Loureiro foi escolhida neste trabalho dado ser uma das mais produzidas na Região Demarcada dos Vinhos Verdes, local onde está amplamente presente o fitoplasma da FD. Em suma, pretende-se esclarecer se videiras infetadas apresentam maior produção de metabolitos e de genes de defesa, e se o tratamento com MeJA induz a ativação destes mecanismos.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Região Demarcada dos Vinhos Verdes

A Região Demarcada dos Vinhos Verdes compreende uma área de 21 mil ha, o que corresponde a 15% da área vitícola nacional. Esta é considerada a maior de Portugal e umas das mais extensas da Europa. Localiza-se na região noroeste do país, na zona tradicionalmente denominada de Entre Douro e Minho. A região dos Vinhos Verdes está delimitada a norte pelo rio Minho, que define parte do limite fronteiriço com Espanha, a sul pelas serras da Freita, Arada e Montemouro e pelo rio Douro. A este encontra-se as serras da Peneda, Gerês, Cabreira e Marão, e a oeste o Oceano Atlântico (CVRVV, 2017).

As condições climáticas desta região são influenciadas pela disposição da rede fluvial e pelas propriedades orográficas da região. O clima é demarcado por períodos irregulares de elevada pluviosidade com média anual de 1500 mm, com maior incidência durante o inverno e primavera. As temperaturas são amenas, não se registando ao longo do ano excessivas amplitudes térmicas. A região apresenta um relevo bastante irregular, constituído por solos essencialmente graníticos, pouco profundos, de textura arenosa e franco arenosa, de acidez elevada e pobres em fósforo (CVRVV, 2017).

Assim, de acordo com métodos culturais como o encepamento e os tipos de condução das vinhas, bem como devido aos tipos de vinhos obtidos e aos diferentes microclimas existentes por toda a região, esta foi repartida em 9 sub-regiões: Amarante, Ave, Baião, Basto, Cávado, Lima, Monção e Melgaço, Paiva e Sousa (Figura 1).

As castas brancas mais produzidas na Região dos Vinhos Verdes são a Alvarinho, Loureiro, Arinto, Trajadura, Avesso e Azal, e as castas tintas dominantes são Barraçal, Vinhão, Espadeiro, Alvarelhão e Amaral (Sogrape, 2017).

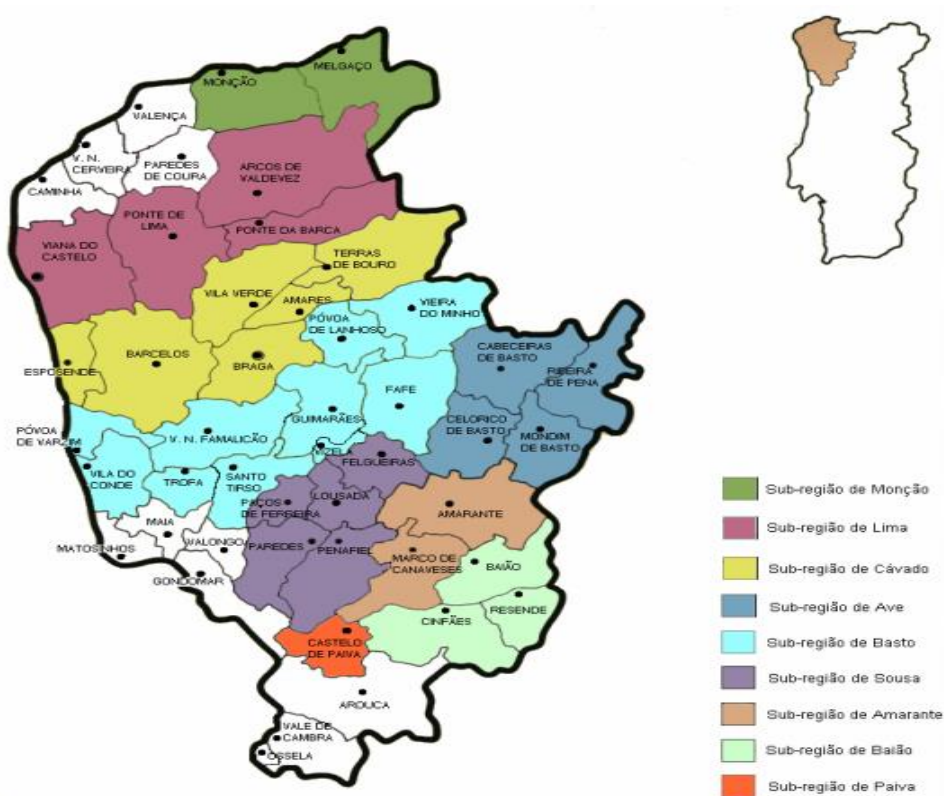


Figura 1- Região Demarcada do Vinho Verde. Adaptada de Oliveira (2000).

### 2.1.1. Casta Loureiro

O Loureiro é uma casta originária do Vale do rio Lima, recomendada em toda Região Demarcada dos Vinhos Verdes, à exceção das sub-regiões Amarante, Baião e Basto. Recentemente nomeada de casta nobre, dá origem a vinhos com acidez elevada e com aromas frutados e florais muito acentuados; produz vinhos “monovarietais”, no entanto é frequentemente utilizada em vinhos de lote, geralmente combinada com as castas Trajadura e Arinto (Infovini, 2017). É uma casta de vigor médio, com porte meio ereto a horizontal, com afinidade com a maioria dos porta-enxertos utilizados na região, nomeadamente SO4 e 196-17, tendo recentemente obtido bons resultados com o 101-104. É muito sensível ao oídio, escoriose, podridão cinzenta e aos ácaros e sensível ao míldio (Machado, 2011). A folha adulta caracteriza-se por ser de tamanho médio, pentagonal, quinquelobada, de perfil irregular com elevação dos lóbulos de contorno revoluto, medianamente bolhosa, às vezes com enrugamento (Infovini, 2017).

A casta loureiro é muito produtiva e fértil, possui em média duas inflorescências por lançamento, dando origem a cachos grandes e compridos, de compacidade média, com pedúnculo de comprimento médio e lenhificação média. Os bagos têm um tamanho médio e uniforme, são arredondados com cor verde amarelada, com pruína e película de espessura média e hilo pouco parente. Os sarmentos de superfície estriada e



costada de cor amarelada, são extensos e vigorosos, com entre-nós de comprimento médio e relativamente volumosos (Infovini, 2017).

## 2.2. Fitoplasmas

Os fitoplasmas foram identificados em 1967 (Galleto & Marzachi, 2010) e denominados de MLOs (*Mycoplasma-like organisms*) devido à semelhança morfológica com os micoplasmas, ambos pertencentes à classe *Mollicutes* (Bertaccini & Duduk, 2009). Na década de 90, o termo fitoplasma foi proposto como substituto de MLOs (Galleto & Marzachi, 2010). Os fitoplasmas são na verdade um tipo de bactérias sem parede celular, que conseguem colonizar simultaneamente organismos do reino animal e vegetal, movendo-se no floema das plantas e colonizando também insetos. Acredita-se que tenham divergido de bactérias Gram-positivas (IRPCM, 2004; Sugio & Hogenhout, 2012). São pleomórficos, com diâmetros inferiores a um micrómetro e apresentam genomas muito pequenos (680-1,600 kb) com baixo teor de GC (por vezes tão baixo quanto 23%, quantidade pensada ser o limiar de um genoma viável) (Bertaccini & Duduk, 2009). Comparativamente com os seus ancestrais (bactérias pertencentes ao grupo *Bacillus/Clostridium*) os fitoplasmas apresentam os genomas muito mais reduzidos, pois carecem de várias vias para a síntese de compostos necessários à sua sobrevivência (Bai et al., 2006). Por exemplo, os fitoplasmas carecem de genes para a biossíntese de aminoácidos e ácidos gordos, para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa (produção de ATP). Ademais, ao contrário dos micoplasmas, o genoma do fitoplasma também não possui genes para o sistema de fosfotransferase e para metabolizar UDP-galactose em glucose 1-fosfato, sugerindo que os fitoplasmas detêm mecanismos de incorporação de açúcar e um sistema metabólico únicos (Oshima et al., 2003). Por outro lado, estes também não possuem o ciclo das pentoses fosfato (normalmente usado para sintetizar NADPH e para fornecer a ribose-5-fosfato, necessária à síntese de nucleótidos) (Bertaccini & Duduk, 2009). Apesar do genoma reduzido, os fitoplasmas têm genes que codificam sistemas transportadores, tais como do malato, iões metálicos e aminoácidos transportadores, alguns dos quais com múltiplas cópias (Oshima et al., 2003).

A interação fitoplasma-hospedeiro requer uma importação elevada de metabolitos da célula hospedeira, perturbando o equilíbrio metabólico e causando sintomas de doença. Além disso, o genoma do fitoplasma codifica genes de síntese de ácido fólico, o que permite que os fitoplasmas se adaptem a ambientes muito diferentes em plantas e insetos (Oshima et al., 2003).

Os fitoplasmas estão divididos em 19 grupos e mais de 20 subgrupos ribossomais distintos (Montano et al., 2001; Arocha et al., 2005; Lee et al., 2006a; Al-Saady et al., 2008). Esta divisão foi feita com base em análises de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene 16S rRNA. Para diferenciar os fitoplasmas de uma forma mais precisa utilizaram-se marcadores genéticos para genes da proteína ribossômica (rp), secY, tuf e para as sequências da região espaçadora intergênica do rRNA 16S-23S (Smart et al., 1996; Schneider et al., 1997; Martini et al., 2002; 2007; Lee et al., 2004a; b; 2006b). O Grupo de Taxonomia de Fitoplasma IRPCM (IRPCM, 2004) definiu os critérios para a nomeação de novas espécies e estirpes de fitoplasmas, referindo que: “uma nova espécie de *Candidatus* (Ca.) *Phytoplasma* deve referir-se a uma única sequência de genes do rRNA 16S, e uma nova estirpe pode ser reconhecida como novo “*Candidatus Phytoplasma*” se a sua sequência do gene 16S rRNA tiver <97,5% de similaridade com qualquer espécie de “*Candidatus Phytoplasma*” previamente identificada” (Bertaccini & Duduk, 2009).

### 2.2.1. Fitoplasma da Flavescência Dourada

As *Grapevine Yellows* (GY) são o nome comumente atribuído às doenças da videira provocadas por fitoplasmas (Angelini et al., 2001). Atualmente, a FD é a doença mais conhecida do grupo das GY, pelo facto do fitoplasma da FD estar associado a uma das mais importantes e destrutivas doença da vinha, tornando-se a maior ameaça à viticultura europeia (Belli et. al, 2010). Assim, devido ao potencial epidémico do fitoplasma da FD, a doença é classificada como sendo de quarentena no Anexo IIAII da Diretiva n°2000/29 da União Europeia e na Lista A2 da OEPP-EPPO (Organização Europeia e Mediterrânea da Protecção de Plantas) (Prezelj et al., 2013).

O fitoplasma da FD pertence ao grupo “*Elm Yellow*” (EY), também conhecido como fitoplasmas do grupo 16SrV (Angelini et al., 2003). O grupo 16SrV está dividido em dois subgrupos ribossomais (16SrV-D e 16SrV-C) que são diferenciados experimentalmente utilizando polimorfismos em genes específicos, como *rpS3*, *SecY* entre outros (Angelini et al., 2001; Martini et al., 2002; Botti & Bertaccini, 2006; Arnauld et al., 2007). Os dois subgrupos de FD têm diferentes distribuições geográficas, no entanto podem coexistir nas mesmas áreas. A estirpe 16SrV-D prevalece essencialmente no Norte de Itália, França, Espanha e Portugal, enquanto FD 16 SrV-C foi detetada no Norte de Itália, França, Sérvia e Eslovénia. Atualmente, a FD foi detetada nas regiões europeias produtoras de vinha como a Áustria, Croácia, Hungria e Suíça (CABI, 2017) (Tabela 1). Tal como referido anteriormente, ambas as estirpes de FD são transmitidas pelo cicadelídeo *Scaphoideus titanus* Ball (Mori et al., 2002).

Tabela 1- Distribuição da Flavescência Dourada. Adaptada de CABI (2017).

<b>País</b>	<b>Distribuição</b>
Áustria	Presente
Croácia	Distribuição restrita
Eslovénia	Distribuição restrita
Espanha	Presente
França	Distribuição restrita
Hungria	Distribuição restrita
Itália	Distribuição restrita
Portugal	Distribuição restrita
Servia	Distribuição restrita
Suíça	Presente

### 2.3. Inseto vetor

O fitoplasma da FD é transmitido de forma eficaz e epidémica pelo inseto vetor *Scaphoideus titanus* (Lessio & Alma, 2004), um inseto da ordem hemíptera, família cicadellidae (Chuche & Thiéry, 2014), e comumente conhecido por cigarrinha.

A introdução de *S. titanus* na Europa, mais concretamente em França, ocorreu há mais de um século durante a crise de filoxera nas vinhas francesas. Neste período foram importados porta-enxertos da América do Norte para reconstituir a área de vinha atacada (Granett et al., 2001). No entanto, uma parte considerável do material vegetal importado continha ovos de *S. titanus*, que foi intensamente multiplicado em viveiros no sul de França (Carton et al., 2007), iniciando-se assim a proliferação do inseto vetor de uma das doenças mais epidemiológicas da vinha.

Em Portugal, o inseto foi identificado pela primeira vez em 2000, na região de Trás-os-Montes, tendo sido elaborado um Programa de Prospecção Oficial para a deteção do *S. titanus* e da FD. Posteriormente, entre 2006 e 2007 observou-se um aumento da dispersão do inseto na região Norte e foram confirmados os primeiros casos de FD em vinha de produção na região do Entre-Douro-e-Minho (Sá et al., 2010). A propagação de *S. titanus* na Europa ocorre principalmente devido à dispersão das populações, e não a introduções múltiplas do inseto (Bertin et al., 2007; Papura et al., 2009). Atualmente, a distribuição de *S. titanus* encontra-se de Este para Leste, entre Portugal e Roménia, e de Norte para Sul desde Champagne (França) até Basilicata (Itália) (Chuche & Thiéry, 2014).

#### 2.3.1. Ciclo de vida

O *S. titanus*, tal como outras espécies oligófagas, permanece todo o seu ciclo de vida em plantas do género *Vitis* (Chuche & Thiéry, 2014). O seu ciclo de vida (Figura 2) inicia-

se quando as fêmeas começam a postura dos ovos, em grupo ou isoladas, no final do Verão (entre agosto e setembro). Estes são colocados dentro da madeira escoriada dos sarmentos com dois ou mais anos (Bagnoli & Gargani, 2011).

Os ovos permanecem em diapausa durante o inverno, entre 6 a 8 meses. (Chuche & Thiéry, 2012). A eclosão dos ovos depende da dinâmica entre a altitude da vinha, a latitude e as condições climáticas que decorreram durante o ano (Chuche & Thiéry, 2014). Os ovos eclodem em meados de maio, sendo possível encontrar o primeiro instar ninfal até ao final de julho ou meio de agosto, dependendo do ano (Frausin, 2000). Depois da eclosão, os ovos passam por cinco instars ninfais até atingirem o estado adulto com duração variável de sete a oito semanas em França (Boudon-Padiou, 2000), e cinco a sete semanas em Espanha e Itália (Chuche & Thiéry, 2014). Os primeiros adultos surgem no verão, entre junho e julho. Após dez dias da emergência atingem a maturidade sexual e acasalam, e as fêmeas começam a postura dos ovos, iniciando-se assim um novo ciclo (Chuche & Thiéry, 2014),

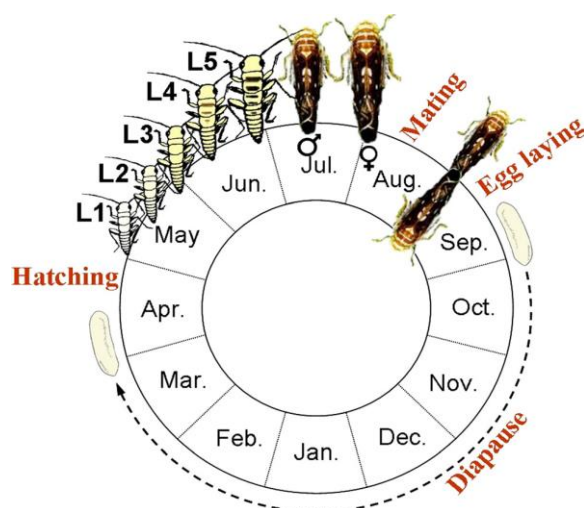


Figura 2- Ciclo de vida de *Scaphoideus titanus*. As datas são indicativas e variáveis conforme o ano e a localização. Retirado de Chuche e Thiéry (2014).

### 2.3.2. Interação inseto vetor-fitoplasma

O *S. titanus* alimenta-se nos vasos condutores das folhas, preferencialmente no floema, mas também no xilema e parênquima (Carle & Mountous, 1965). A perfuração da epiderme pelo inseto é efetuada entre duas células, sendo a direção dos estiletos linear dentro do tecido da planta, podendo ser intra ou intercelular conforme a disposição das células. As ninfas preferem alimentar-se nas nervuras secundárias, e os adultos alimentam-se preferencialmente nas nervuras principais ou nos pecíolos (Chuche & Thiéry, 2014).

O *S. titanus* pode adquirir o fitoplasma desde o primeiro instar até adulto, durante o processo de alimentação em videiras infetadas (Boudon-Padieu et al., 1989). No entanto, para que a infeção ocorra durante a alimentação, é necessário um período de alimentação mínimo e quanto mais duradouro for o mesmo, mais provável é a transmissão do fitoplasma para o inseto (Purcell, 1982). O fitoplasma é extraído do floema através dos estiletos do inseto, atravessa a barreira intestinal e invade a hemolinfa, colonizando a maioria dos órgãos vetoriais. Este processo decorre durante um período de incubação de um mês, durante o qual o fitoplasma se multiplica no citoplasma das células do trato gastrointestinal, particularmente no intestino grosso e intestino médio (Lefol et al., 1994). Posteriormente, o fitoplasma alcança a hemolinfa, atravessando as células intestinais e coloniza todos os órgãos, incluindo a gordura corporal e o cérebro, à exceção das glândulas sexuais (Lefol et al., 1993; 1994). A concentração de fitoplasma aumenta na hemolinfa e depois nas glândulas salivares. Uma vez que a concentração atinge um nível suficiente, o agente infeccioso pode ser transmitido em cada ingestão até a morte do inseto (Chuche & Thiéry, 2014).

Após a entrada na planta, a acumulação do fitoplasma ocorre essencialmente nas folhas, e em menor concentração a partir dos pecíolos. Este processo infeccioso irá provocar necroses nos elementos do floema, deposição anormal de calose nos tubos crivosos, espessamento da parede e acumulação de amido nos lançamentos das plantas suscetíveis (Santi et al., 2013).

## 2.4. Sintomas da Flavescência Dourada

O fitoplasma da FD possui um período de latência entre um e três anos, sendo possível durante este intervalo de tempo as videiras permanecerem assintomáticas (DGAV, 2013). Quando expressa, a sintomatologia da FD é mais evidente no verão, no entanto na primavera, nomeadamente entre os meses de maio e junho, verifica-se nas videiras mais suscetíveis um crescimento reduzido da cepa, assim como o atraso ou ausência do abrolhamento dos gomos (Galleto et al., 2016). Entre os estados fenológicos floração-vingamento, as inflorescências que surgem são raquíticas e acabam por secar e cair ao toque. Mais tarde verifica-se a murchidão dos cachos, no início da maturação, devido ao dessecamento do pedúnculo (Figura 3A) (Machado, 2014).

As folhas apresentam alteração na coloração assim como o enrolamento da margem. Em cultivares de uva branca, existe um amarelecimento da página da folha exposta ao sol, o que confere um brilho metálico à superfície da folha. Mais tarde, surgem manchas amarelo-creme bem definidas com alguns milímetros de diâmetro ao longo das nervuras principais. Estas manchas aumentam e estendem-se por toda a

superfície foliar ao longo das nervuras (Figura 3B). As cultivares tintas desenvolvem um padrão semelhante de alteração de cor das folhas, no entanto as descolorações são avermelhadas. A zona central das áreas descoloradas torna-se necrótica e seca (Figura 3C). As folhas tornam-se frágeis e rígidas, sendo frequentemente destacadas pelo vento, apresentando uma disposição em forma de “telha” (Figura 3D). Os pâmpanos apresentam um mau atempamento permanecendo frágeis e flexíveis e conferindo à cepa um porte prostrado (“porte chorão”), surgindo mais tarde a necrose dos botões apicais e laterais. Se a infecção for tardia, a lenhificação será parcial. Estes lançamentos infetados tardiamente também enegrecem no inverno, mas sobrevivem e crescem pouco na primavera seguinte. Nas cultivares mais resistentes, a não-lignificação é mais pronunciada, estando limitada a certos entre-nós. Numerosas pústulas pretas surgem ao longo dos pâmpanos infetados nas cultivares suscetíveis. No final do verão, aparecem fissuras longitudinais na casca na base dos ramos doentes (CABI, 2017). Em campo a FD identifica-se através de três sintomas em simultâneo: a alteração da pigmentação das folhas (amarelecimento das folhas nas castas brancas e o avermelhamento nas castas tintas), o não atempamento dos pâmpanos e a morte das inflorescências/ cacho (Machado, 2014).

Contudo, as videiras infetadas com o decorrer do tempo podem demonstrar uma remissão espontânea dos sintomas, à qual está associado o desaparecimento do agente causal na canópia; designando-se este processo por recuperação (Gambino et al., 2013). A taxa de recuperação depende da cultivar (Belli et al., 2010) e os rendimentos das plantas recuperadas são sempre inferiores aos das plantas nunca infetadas, independentemente do período de recuperação (Morone et al., 2007). No entanto, Morone et al. (2007), verificaram que videiras recuperadas apresentaram um aumento de 80% no rendimento em relação a videiras infetadas.



Figura 3- Sintomas da Flavescência Dourada nos cachos (A); em folhas de casta em folhas de castas brancas (B); e em castas tintas (C); Disposição em forma de “telha” (D).

## 2.5. Métodos de deteção

A deteção e identificação de fitoplasma baseia-se na deteção molecular em espécimes de insetos vetores ou em amostras de tecido vegetal, podendo ser efetuada recorrendo a metodologias de triagem de baixo ou alto rendimento (Oliveira et al., 2017).

De modo geral, apesar de as técnicas moleculares utilizadas na deteção da FD serem sensíveis, existe um fator limitante associado à deteção associado à variação sazonal do título de fitoplasma. O fitoplasma tem também uma distribuição irregular na planta, assim como uma reduzida concentração em hospedeiros lenhosos, particularmente em material vegetal recentemente enxertado (Duduk & Mori, 2012). As técnicas de serologia, como a DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), foram aplicadas com sucesso na deteção da FD utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais e sondas moleculares (Boudon-Padieu et al., 1989; Daire et al., 1992; Bertaccini et al., 1993). No entanto, devido aos elevados custos, desde o início da década de 90, várias metodologias baseadas em PCR, têm sido otimizadas, o que permitiu obter novos conhecimentos sobre a diversidade e inter-relações genéticas dos fitoplasmas (Bertaccini & Duduk, 2009). Diversos protocolos de



PCR quantitativo (q-PCR) foram desenvolvidos como métodos de detecção rápida (Angelini et al., 2007), sendo que o q-RT-PCR (*quantitative Real Time PCR*) demonstrou ser cinco vezes mais sensível do que o q-PCR (Margaria et al., 2009). Além disso, uma RT-PCR Triplex foi testada para a detecção do fitoplasma da FD, apresentando maior sensibilidade (Pelletier et al., 2009). Para além dessas metodologias, foram desenvolvidos ensaios baseados em LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), capazes de detetar aproximadamente em uma hora a presença do fitoplasma do grupo 16 SrV em videira (Kogovšek et al., 2015).

## 2.6. Métodos de combate

### 2.6.1. Métodos convencionais

Atualmente, ainda não existe uma estratégia completamente eficiente para eliminar o fitoplasma da FD na planta e no vetor. Tal como em muitas doenças transmitidas por insetos, o controlo desta epidemia é feito através da monitorização do vetor, através da utilização de inseticidas e da adoção de medidas profiláticas (Chuche & Thiéry, 2014). A monitorização de *S. titanus* pode ser feita através de quatro técnicas principais: 1) contagem do número de ninfas na parte inferior das folhas; 2) técnica das pancadas, que consiste em efectuar com um bastão um conjunto de pancadas nos ramos das videiras, e com auxílio de um funil recolher as ninfas presentes na folhagem (Figura 4A e Figura 4B); 3) utilização de um aparelho de sucção, por exemplo D-vac, e 4) uso de armadilhas cromotrópicas, sendo as duas últimas técnicas preferenciais para os adultos.

A precisão destes métodos de monitorização é variável, uma vez que estes são suscetíveis às variações de clima, de estação, de gestão da vinha e da posição da planta na vinha (interna ou bordadura) (Chuche & Thiéry, 2014). Por outro lado, o controlo vetorial de *S. titanus* é feito através de tratamentos com inseticidas dirigidos principalmente contra os instares móveis (ninfas e adultos). Estes tratamentos são feitos duas a três vezes por ano nas zonas infetadas, podendo ainda ser complementados com um tratamento no inverno contra os ovos (Chuche & Thiéry, 2014). No entanto, os inseticidas convencionais, mesmo quando utilizados com frequência, não têm um efeito imediato e não conseguem impedir a transmissão do fitoplasma por *S. titanus*, sendo assim uma estratégia de eficácia limitada (Weintraub & Wilson, 2010).

A aplicação do tratamento com água quente (*Hot Water Treatment* - HWT) em material de propagação (porta-enxertos, bacelos e estacas enxertadas) é uma das estratégias mais frequentemente utilizadas para prevenir a disseminação da FD. Este processo consiste na imersão do material de propagação durante 45 min em água a



50°C, sendo eficaz na eliminação do fitoplasma da FD e dos ovos de *S. titanus* (Caudwell et al., 1997).

A remoção de cepas infetadas é uma prática comum para o controle da FD, sendo obrigatório o arranque de toda a parcela quando 20% das plantas doentes são detetadas (Boudon-Padieu, 2002). Contudo, quando as plantas sintomáticas apresentam uma distribuição dispersa é aconselhável inspecionar e analisar também as cepas assintomáticas, uma vez que estas podem servir de reservatórios de inóculo de FD, contribuindo assim para a disseminação da doença (Oliveira et al., 2017). Neste contexto também é recomendada a destruição da vegetação infestante que envolve a vinha por meios mecânicos e químicos (Bosco & Mori, 2013). Após o arranque, deve efetuar-se um tratamento químico contra o vetor para manter a taxa de incidência de FD baixa (Pavan et al., 2012). Por outro lado, após a realização da poda, a madeira deve ser queimada ou enterrada em vez de moída porque suprime os ovos do vetor (Boudon-Padieu, 2000; Bosco & Mori, 2013).

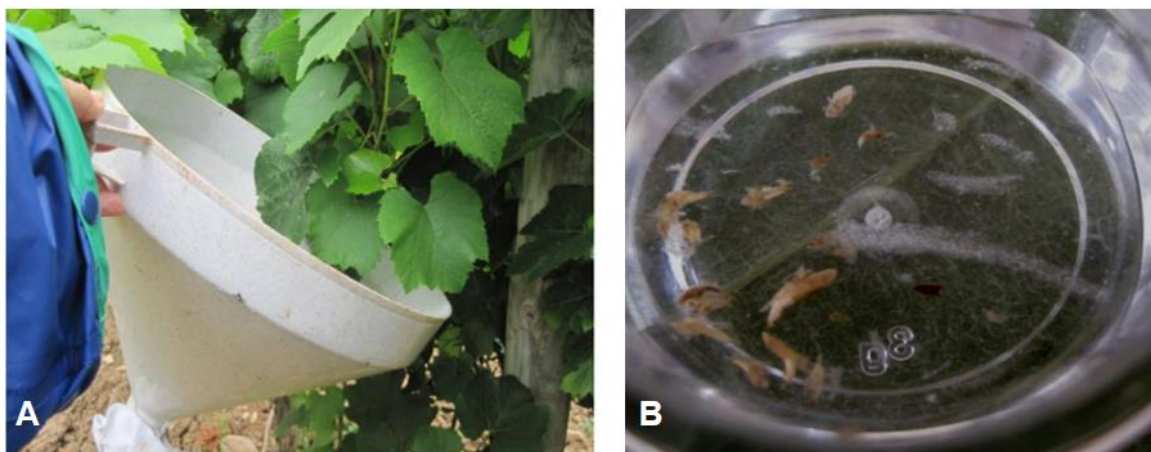


Figura 4- Técnica das pancadas, método de recolha (A); ninfas capturadas (B). Retirado de Andrade et al. (2015).

## 2.6.2. Novas perspectivas na gestão da Flavescência Dourada

As estratégias para restringir a propagação da FD anteriormente referidas são difíceis de implementar e onerosas, pelo que atualmente se encontram em desenvolvimento várias abordagens com grande potencial no controlo da FD.

### 2.6.2.1. Uso de espécies *Vitis* e cultivares *V. vinifera* naturalmente resistentes à FD

De uma maneira geral, as variedades de videiras parecem mostrar a mesma suscetibilidade relativa às várias doenças GY que ocorrem em todo o mundo, embora o

fitoplasma da FD seja de facto o mais agressivo (Jarausch et al., 2013). Diferentes suscetibilidades também foram observadas em diferentes clones da mesma *V. vinifera* (Borgo et al., 2006). Os porta-enxertos surgem como uma fonte promissora de resistência porque apenas alguns genótipos de porta-enxertos foram infetados naturalmente (Borgo et al., 2009) e alguns porta-enxertos inoculados apresentaram poucos ou mesmo nenhum sintoma de doença (Jarausch et al., 2013).

Recentemente, foi iniciado um estudo para avaliar a suscetibilidade à doença FD das principais cultivares de *V. vinifera*, híbridos *Vitis* utilizados como porta-enxertos, mas também espécies selvagens de *Vitis* provenientes de continentes norte-americanos e asiáticos (Jarausch et al., 2013). As castas *Cabernet Sauvignon*, *Chardonnay* e *Grenache* foram consideradas altamente suscetíveis à FD, uma vez que apresentaram sintomas e elevada concentração de fitoplasma. A casta *Pinot Noir* foi considerada de suscetibilidade intermédia, enquanto *Merlot* e *Syrah* pareceram ser as menos suscetíveis pois não foram identificados sintomas e a concentração de fitoplasma encontrada foi muito reduzida. Outras espécies de *V. vinifera* terão que ser analisadas quanto à sua suscetibilidade a fim de completar este *ranking*, assim como a influência dos porta-enxertos tolerantes ao desenvolvimento da doença em cultivares suscetíveis (Jarausch et al., 2013).

#### 2.6.2.2. Utilização dos endófitos como ferramenta sustentável de bio controlo da FD

Os endófitos podem ser fungos ou bactérias que em associação com o hospedeiro ou com o inseto vetor podem constituir uma estratégia para o combate da FD (Oliveira et al., 2017). Recorrer à utilização destes organismos para o controlo de doenças em plantas pode trazer diversas vantagens: o seu baixo impacto ambiental; são eficientes em quantidades reduzidas; a sua multiplicação é controlada pela planta, assim como pelas populações microbianas indígenas; decompõe-se mais rápido que os pesticidas convencionais; e podem ser utilizados em sistemas de produção convencionais ou integrados (Berg et al., 2009).

O sucesso da utilização destes microrganismos como agentes de controlo biológico contra a infeção por fitoplasmas depende do estudo entre endófito e hospedeiro. Sendo que atualmente, já existem estudos que reportam o envolvimento de bactérias endófitas no fenómeno de recuperação contra doenças provocadas por fitoplasmas em videira (Bulgari et al., 2011) e em macieira (Bulgari et al., 2012). Estes estudos sugerem que a utilização de bactérias endófitas poderá contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia alternativa para o combate de doenças por

fitoplasmas, nomeadamente a FD, uma vez que estes desempenham uma função de controlo biológico.

### 2.6.2.3. Gestão integrada do inseto vetor

Os principais métodos utilizados para a gestão integrada de vetores são a interrupção do acasalamento e a estratégia “*push-pull*”.

Durante o acasalamento, os machos e as fêmeas comunicam por sinais vibratórios (Chuche & Thiéry, 2014). Os machos podem começar a emitir sinais vibratórios após 24h da emergência, enquanto as fêmeas só o conseguem fazer seis dias depois da emergência, período em que atingem a maturidade sexual (Mazzoni et al., 2009). O sinal vibratório pode ser transmitido entre duas plantas vizinhas pelo ar (Eriksson et al., 2011), facilitando a comunicação a longa distância em habitats densos, como as vinhas. A propagação do sinal, que depende da distância entre folhas, varia com a arquitetura da vinha (Chuche & Thiéry, 2014). Deste modo, foi desenvolvido o método de interrupção do acasalamento, que consiste em provocar distúrbios vibratórios de modo a interferir com os sinais emitidos entre machos e fêmeas. A interrupção sexual foi bem-sucedida em laboratório e as primeiras experiências em campo também foram promissoras (Mazzoni et al., 2009; Eriksson et al., 2012). O desafio atual consiste em transferir esses resultados para uma escala maior. Uma estratégia semelhante não poderia ser estendida a distúrbios do comportamento larval porque as ninfas não usam comunicação com base em vibrações (Chuche et al., 2011).

A estratégia “*push-pull*” consiste na manipulação do comportamento dos insetos através da utilização combinada de itens repulsores e atraentes, como o uso de plantas capazes de atrair pragas para determinada área, onde posteriormente serão destruídas (Cook et al., 2007). A utilização desta técnica contra os vetores de fitoplasma em uvas já apresentou resultados promissores contra *Hyalesthes obsoletus* em Israel (Zahavi et al., 2007), podendo também ser efetivo no tratamento contra *S. titanus*. Os itens repulsores podem incluir partículas de argila de caulinita, estas foram empregues em ensaios de campo e demonstraram ser bons candidatos contra insetos sugadores. Atualmente, estas já são utilizadas em vinhas norte americanas (Daniel et al., 2005; Tubajika et al., 2007; Markó et al., 2007). Por outro lado, os cicadelídeos têm preferência para a *V. americana* em detrimento da *V. vinifera* (Lessio et al., 2007). Assim, é possível combinar o efeito de castas mais e menos atraentes para o controlo de *S. titanus*. Para isso é efetuado um tratamento com caulinita em *V. vinifera*, afastando o inseto para as cepas da bordadura, *Vitis americana*. Desta forma, a população de *S. titanus* ficaria

restrita a uma determinada área onde o viticultor poderia posteriormente efetuar um tratamento com inseticidas (Caudwell et al., 1972).

#### 2.6.2.4. Modelos preditivos

Rigamonti et al. (2011) desenvolveram um modelo de fenologia com o objetivo de melhorar de tempo de aplicação dos reguladores de crescimento. Este engloba cinco parâmetros distintos a) início do desenvolvimento pós-dormência dos ovos; b) os padrões de incubação dos ovos; c) a duração das ninfas do primeiro estágio de desenvolvimento; d) o desenvolvimento e sobrevivência do instar subsequente; e) o desenvolvimento do grupo e a sua transição para o instar adulto. Assim, o estudo da interação destes parâmetros permitiu desenvolver um modelo que prevê a dinâmica das estruturas etárias, o início da incubação dos ovos e a ocorrência do terceiro instar, bem como o surgimento dos adultos (Rigamonti et al, 2011).

### 2.7. Uso de elicitadores

Os elicitadores são moléculas sinalizadoras endógenas que estimulam os mecanismos de defesa naturais da planta quando esta é sujeita a stress biótico ou abiótico (Belhadj et al., 2008). Existem elicitadores abióticos, tais como iões metálicos e compostos inorgânicos, e elicitadores bióticos induzidos por fungos, bactérias, vírus ou herbívoros, componentes de paredes celulares de plantas, bem como produtos químicos que são libertados no local lesado pelas plantas após ataque do agente patogénico ou herbívoro (Zhao et al., 2005).

Estas moléculas têm baixo impacto ambiental e não criam resistências nos agentes patogénicos, ao contrário do que acontece frequentemente com o uso de pesticidas convencionais (Ruiz-García & Gómez-Plaza, 2013). Diversas moléculas podem atuar como elicitadores, nomeadamente oligossacarídeos e polissacarídeos, péptidos, proteínas e lípidos (Belhadj et al., 2006). O tratamento com estes compostos provoca uma série de reações de defesa, incluindo a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO), a biossíntese de fitoalexinas, o reforço da parede celular, deposição de calose e a síntese de enzimas e proteínas de defesa. As ERO conduzem a uma resposta hipersensível (HR) da planta, que consiste na morte rápida e localizada de células do local de infeção de forma a delimitar o crescimento do agente patogénico (Thakur et al., 2012). Após, à ativação da HR, as partes distais não infetadas da planta podem desenvolver resistência a uma infeção futura, através de um fenómeno denominado por resistência sistémica adquirida (Thakur et al., 2012).

### 2.7.1. Interação elicitador-planta

A ativação da biossíntese de metabolitos secundários em plantas inicia com um sinal extracelular ou intracelular que é percebido por um recetor na superfície da membrana plasmática ou numa membrana intracitoplasmática. A perceção do sinal do elicitador desencadeia uma rede de transdução de sinal que conduz à ativação ou biossíntese de fatores de transcrição, que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo secundário das plantas. As enzimas ou metabolitos resultantes deste processo catalisam a biossíntese dos metabolitos secundários alvo (Zhao et al., 2005). Existem assim vários tipos de elicitadores, alguns dos quais estão descritos um pouco extensivamente nas secções abaixo.

### 2.7.2. Ácido Salicílico

O ácido salicílico (SA) é um indutor comumente associado à resistência sistémica adquirida, no entanto não é um indutor universal para a produção de metabolitos defensivos das plantas. O SA acumula-se rapidamente no local de infeção e leva a uma reação hipersensível, espalhando-se depois para outras partes da planta, de forma a induzir um conjunto de repostas defensivas (Zhao et al., 2005), como por exemplo ativação da PAL (*Phenylalanine ammonia-lyase*), enzima chave no metabolismo dos fenilpropanoides (Chen et al., 2006). Os elicitadores de fungos também estimulam a acumulação de SA em determinadas culturas de células vegetais, apesar da indução da maioria dos metabolitos secundários por elicitadores de fungos ser independente de SA. Isto sugere que a acumulação de metabolitos secundários na planta é uma resposta local e não sistémica (Zhao et al., 2005). No entanto, SA é responsável por induzir a expressão de genes relativos à biossíntese e à produção de algumas classes de metabolitos secundários, como a escopoletina, uma das fitoalexinas do tabaco (Taguchi et al., 2001). Por sua vez, Castro (2015), estudou o efeito da aplicação de 25 mM de SA na resposta de defesa da videira contra a infeção por FD, verificando que este elicitador induziu de forma positiva a expressão de genes que codificam proteínas de defesa em plantas infetadas, como a Thau I (*Thaumatococcus* I). No entanto, neste mesmo trabalho, a aplicação de SA conduziu a um decréscimo de número de cachos produzidos, devido à sua fito-toxicidade.

### 2.7.3. Etileno

O etileno é uma fito-hormona que está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos da planta, como o crescimento, o desenvolvimento e o amadurecimento de frutos. A produção de etileno é rapidamente induzida nas plantas como resposta a uma

variedade de stresses bióticos como a infecção viral ou fúngica (Ecker et al., 1987). No entanto existe, um número limitado de casos em que a acumulação de metabolitos secundários da planta pode ser afetada pelo etileno, e os efeitos podem ser variáveis. Assim, de acordo com El-Kereamy et al. (2003), o tratamento com etileno aumenta a produção de flavonóides, antocianinas e estilbenóides em culturas celulares de videira (*Vitis vinifera*). O etileno é necessário para a produção de fitoalexinas em cenoura (Fan et al., 2000), desempenhando também um papel essencial na emissão de voláteis em plantas de milho atacadas por herbívoros (Schmelz et al., 2003; Paré et al., 1998).

#### 2.7.4. Metil Jasmonato

O ácido jasmônico (JA) e os seus derivados têm sido estudados como elicitadores que funcionam como transdutores de sinais para a produção de metabolitos secundários. A aplicação de JA e dos seus derivados, como o metil jasmonato (MeJA), induz a síntese de uma grande diversidade de produtos secundários tais como terpenóides, flavonóides, alcalóides e fenilpropanóides, entre outros (Zhao et al., 2005).

Segundo Bidabadi et al. (2013), a aplicação exógena de MeJA em videira contribuiu positivamente para a eficiência fotoquímica da planta, na medida em que se verificou uma recuperação da fluorescência da clorofila foliar. Por outro lado, o tratamento induziu a uma maior atividade enzimática da catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase. O tratamento com MeJA também revelou ser eficaz no estímulo da PAL, na síntese de chalcona, síntese de estilbenos, inibidores de proteinases, na expressão do gene da quitinase, bem como também na acumulação de antocianinas e trans-resveratrol (Belhadj et al., 2008). Um tratamento de pré-colheita com 10 mM de MeJA demonstrou melhorar os níveis de flavonóides em uvas (Ruiz-García et al., 2012) e o nível de resveratrol em determinadas cultivares de videira (Esna-Ashari & Mahmoodi Pour, 2011).

Especificamente, são poucos os trabalhos que incidem no papel do MeJA na resposta de defesa contra a infecção por fitoplasmas. No entanto, um estudo recente reporta o efeito deste elicitador em videiras infetadas com FD, no qual se verificou um aumento do índice de fertilidade e do teor de clorofilas em plantas doentes, em consequência da aplicação de um tratamento com 12,5 mM de MeJA (Pinto, 2016).

### 2.8. Metabolitos de defesa

As plantas produzem uma vasta e diversificada variedade de compostos orgânicos, cuja maioria não participa diretamente no seu crescimento e desenvolvimento. Estas substâncias são frequentemente referidas como metabolitos secundários, e muitas

vezes são diferencialmente distribuídas entre grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Os metabolitos primários, em contrapartida, como fitoesteróis, lípidos, nucleótidos, aminoácidos e ácidos orgânicos, são encontrados em todas as plantas e desempenham papéis metabólicos essenciais (Croteau et al., 2000).

Os metabolitos secundários são frequentemente sintetizados a partir de metabolitos primários; são acumulados em altas concentrações [1-3% do peso fresco], podem apresentar alta toxicidade e um efeito biológico noutros organismos, possuem diferentes locais de produção e acumulação e em alguns casos são acumulados nos vacúolos sob a forma glicosídica ou acumulam-se em estruturas secretoras especiais, como por exemplo, tricomas, dutos e canais (Figueiredo et al., 2008).

### 2.8.1.Saponinas

As saponinas são um grupo de metabolitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal (Haralampidis et al., 2002). Estes metabolitos são armazenados em células vegetais como precursores inativos, que são facilmente convertidos por enzimas vegetais em antibióticos biologicamente ativos, em resposta ao ataque de patogênicos. Estes compostos também podem ser considerados "pré-formados", visto que as enzimas da planta que os ativam já estão presentes em tecidos vegetais saudáveis (Osbourn, 1996). As saponinas são compostos glicosilados que podem ser divididos em três grupos principais: triterpenóides, esteroides ou um glicoalcaloide esteroide (Figura 5A e 5B). Estas são encontradas principalmente em plantas dicotiledóneas, mas também em algumas monocotiledóneas, sendo que as saponinas esteroides ocorrem principalmente em monocotiledóneas, como *Lilliaceae*, *Droscoraceae* e *Agavaceae* e em determinadas dicotiledóneas, como "*foxglove*" (Mert -Türk, 2006).

As saponinas têm capacidade de se complexarem na presença de esteróis nas membranas fúngicas; provocam a formação de poros e perda da integridade da membrana desempenhando um importante papel antifúngico (Morrisey & Osbourn, 1999). As avenacinas triterpenóides têm um papel na defesa das plantas contra o ataque de fungos fitopatogênicos em raízes de aveia (Mert -Türk, 2006). São uma família de quatro moléculas estruturalmente relacionadas, as avenacinas A-1, B-1, A-2 e B-2 (Crombie & Crombie, 1986). A avenacina A-1 é a mais abundante das quatro em extratos de raízes de aveia jovens, que compõem cerca de 70% do conteúdo total de avenacina (Crombie et al., 1986). Um estudo que incidiu na importância das avenacinas na determinação da resistência da aveia ao fungo radicular *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, responsável pela doença "*take all*", demonstrou que existe pouca variação natural no conteúdo de avenacina dentro das espécies de aveia. No entanto, pelo menos

uma espécie de aveia diploide, a *Avena longiglumis*, apresentou falta de avenacina A-1, e mostrou ser mais suscetível a doenças fúngicas do que os seus parentes produtores de avenacina deste tipo (Mert -Türk, 2006).

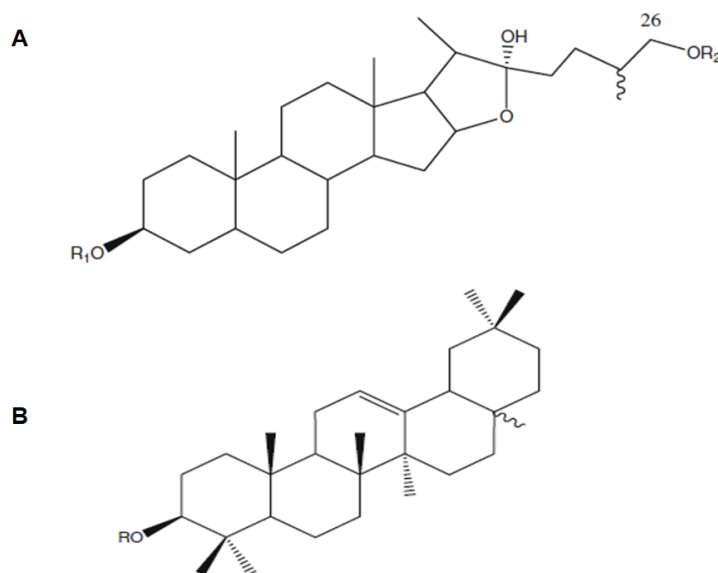


Figura 5- Saponinas glicoalcaloides (A); triterpenóides (B). Adaptada de Golaw ska (2007).

## 2.8.2.Prolina

A prolina é um aminoácido essencial para o metabolismo primário (Szabados et al. 2009). A acumulação de prolina foi relatada durante condições de seca (Choudhary et al., 2005), alta salinidade (Yoshiba et al., 1995), radiação UV elevada (Saradhi et al., 1995), metais pesados (Schat et al., 1997), stress oxidativo elevado (Yang et al., 2009), e em resposta a stresses bióticos, como a presença de *Agrobacterium tumefaciens* (Haudecoeur et al., 2009).

A função osmo-protetora da prolina foi descoberta inicialmente em bactérias, nas quais foi detetada uma relação causal entre a acumulação de prolina e a tolerância ao sal (Csonka et al., 1988). No entanto, a correlação entre acumulação de prolina e a tolerância ao stress abiótico em plantas nem sempre é evidente. Um estudo em arroz demonstrou que o teor de prolina é elevado em variedades tolerantes à seca (Choudhary et al., 2005), contrariamente a um estudo em cevada (*Hordeum vulgare*) que verificou que o teor de prolina não está correlacionado com a tolerância ao sal (Widodo et al., 2009). Adicionalmente, um estudo em trigo demonstrou que as variedades que apresentaram uma estabilidade no rendimento em condições de seca, foram aquelas que conseguiram manter o conteúdo de prolina, bem como a proporção do comprimento da raiz (Hong et al., 2000). Por outro lado, o aumento do teor em prolina



também foi reportado em plantas de tomate em resposta à infecção por *Alternaria solani* (Kumari et al., 2017).

### 2.8.3. Lenhina

A lenhina é um polímero fenólico complexo, importante para o suporte mecânico, transporte de água e defesa em plantas vasculares, predominantemente presente nas paredes secundárias das plantas. Este polímero é responsável por conferir resistência à compressão e garantir a hidrofobicidade das paredes das células do xilema, depositando-se durante a diferenciação terminal dos traqueídeos e de outros tipos de células. A resistência do xilema aos stresses compressivos é indispensável para o crescimento e o desenvolvimento. A insolubilidade e a complexidade do polímero de lenhina tornam-no resistente à degradação pela maioria dos microorganismos. Assim, a lenhina desempenha uma função importante na defesa da planta (Campbell & Sederoff, 1996).

Um estudo elaborado por Nunes da Silva et al. (2013), sobre a avaliação da suscetibilidade de *Picea abies* e *Cupressus lusitanica* ao nemátodo do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*), demonstrou que sete dias após a inoculação com nemátodo em *P. abies* e *C. lusitanica* houve um aumento significativo da biossíntese de lenhina. Surgiu assim a hipótese de que a produção de lenhina pode constituir um fator de resistência contra o nemátodo do pinheiro, possivelmente porque os tecidos lenhificados são capazes de restringir a disseminação do nemátodo no hospedeiro (Franco et al., 2011). No entanto, este aumento da concentração de lenhina ocorreu exclusivamente no período de sete dias após a inoculação, verificando-se que no decorrer da experiência o aumento de lenhina não foi significativo de acordo com o esperado (Nunes da Silva et al., 2013). Por outro lado, Punelli et al. (2016), reportaram uma repressão da biossíntese de lenhina em videira cv. Montepulciano em consequência da infecção pelo fitoplasma de Bois Noir.

### 2.8.4. Fenólicos e Flavonóides

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários (Balasundram et al., 2006), que desempenham um papel essencial na fisiologia e morfologia da planta (como por exemplo, pigmentação). Estão envolvidos nos processos de crescimento e reprodução, bem como conferem às plantas resistência a agentes patogênicos e a predadores (atuando como fitoalexinas ou aumentando a adstringência) (Bravo, 1998). Estruturalmente, os compostos fenólicos possuem um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxilo, e variam desde moléculas fenólicas simples até compostos

altamente polimerizados (Bravo, 1998). Embora tal diversidade estrutural resulte na ampla gama de compostos fenólicos que ocorrem na natureza, os compostos fenólicos podem ser categorizados em várias classes, dos quais se destacam os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (Balasundram et al., 2006).

Os flavonóides constituem o maior grupo de fenóis da planta, representando mais da metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente. Estes compostos têm baixo peso molecular e são constituídos por quinze átomos de carbono, dispostos numa configuração C6-C3-C6 (Balasundram et al., 2006). Os flavonóides são um grupo biologicamente grande e quimicamente diverso de metabolitos secundários que podem ser divididos em subgrupos incluindo antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonóis e isoflavonois. Vários flavonóides são princípios ativos de plantas medicinais pelo que têm efeitos farmacológicos. Estes também atuam na própria planta como compostos fisiologicamente ativos e agentes de proteção contra stresses, contribuindo de forma significativa para a resistência da planta (Treutter, 2006). Deste modo, foram estudados os efeitos fisiológicos dos flavonóides em plantas, na resistência ao frio (Chalker-Scott & Krahmer, 1989) na resistência à seca (Moore et al., 2005) e na resposta contra a infecção por fitoplasmas (Margaria et al., 2014). Tattini et al. (2004), também sugeriram que os flavonóides antioxidantes possuem funções protetoras durante o stress provocado pela seca. Por outro lado, Barceló e Poschenrieder (2002) concluíram que estes compostos podem auxiliar as plantas a sobreviver em solos ricos em metais tóxicos, como o alumínio. Os flavonóides também podem atuar como moléculas atrativas para microrganismos patogénicos como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas syringae*, servindo conseqüentemente de indutores dos genes de virulência (Mo et al., 1995).

Em suma, como descrito nas secções anteriores, são vários os trabalhos que descreveram o efeito da aplicação de elicitadores na ativação de mecanismos de defesa em plantas contra o ataque de agentes patogénicos. No entanto, até ao momento, ainda são poucos os que exploram a utilização destes compostos, nomeadamente do MeJA, como fatores indutores da síntese de metabolitos de defesa em resposta à infecção por fitoplasmas, tais como o da FD.

## 2.9. Estudos Genéticos em plantas infetadas com Flavescência Dourada

Os métodos moleculares até à data têm sido frequentemente utilizados para a identificação de fitoplasmas que afetam a videira. Porém, os estudos efetuados sobre as bases moleculares da interação entre planta e fitoplasma ainda são reduzidos, nomeadamente, entre o fitoplasma da FD e videira (Margaria & Palmano, 2011).

No entanto, a fim de colmatar as lacunas no conhecimento referentes a esta temática, têm-se recorrido a estudos de qRT-PCR para avaliar a expressão genética diferencial em videiras infetadas com fitoplasma em relação a videiras saudáveis (Hren et al., 2009; Landi & Romanazzi, 2011). Sendo possível através deste método analisar o efeito da infeção ao nível da transcrição de determinados genes que, codificam proteínas PR (*pathogenesis-related protein*), um grupo de proteínas induzidas em situações patológicas ou de stress, tais como, Thau I (*Thaumatococcus I*), Thau II (*Thaumatococcus II*), Osmot (*Osmotin-like Protein*), PBSP (*Plant Basic Secretory Protein*) e estão envolvidos em processo de obtenção de energia como a fotossíntese, RubAct (*Rubisco Activase AAA+*) e na degradação de proteínas, Prot.  $\alpha 5$  (*Proteasome  $\alpha 5$  subunit*) (Margaria & Palmano, 2011).

Estudos de proteómica, também têm sido efetuados com o objetivo de analisar a produção de proteínas de defesa desencadeada pela infeção por FD (Oliveira et al., 2017). Margaria e Palmano (2011), monitorizaram os efeitos da infeção de FD no perfil da expressão das proteínas vegetais, verificando que 33 proteínas foram reguladas de forma diferente em videiras infetadas. Estudos do mesmo grupo demonstraram diferenças na resposta da videira à infeção por fitoplasma, recorrendo a uma abordagem proteómica e fosfo-proteómica. Através desta metodologia identificaram 48 proteínas que apresentaram alterações diferenciais em abundância, fosforilação ou ambas, em resposta à infeção por fitoplasma da FD. Contudo, apesar de existirem estudos relativos à expressão de genes em plantas infetadas com FD, presentemente não há nenhum que relacione o efeito da aplicação de MeJA na expressão de genes envolvidos na resposta de defesa da videira contra a infeção da FD.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Localização do Ensaio

As amostras biológicas, folhas de videiras saudáveis e infetadas com FD, foram recolhidas ao pintor, a 25 de agosto de 2016 na Quinta do Corvo (Figura 6). Esta situa-se em Freitas, concelho de Fafe, (41°31'03.52"N 8°12'45.59"O), pertencente à Região dos Vinhos Verdes. A Quinta localiza-se numa zona com declive suave (2 a 5%), onde predominam os solos de origem granítica, de textura franco-arenosa, com uma exposição solar a sul e uma altitude compreendida entre os 300 e 400 m. A vinha tem uma idade média de 24 anos, e dispõe de área de 8 hectares, na qual são plantadas castas regionais como o Loureiro, Alvarinho, Arinto/ Pedernã, Trajadura, Barraçal, Espadeiro, Padeiro e Vinhão. As cepas foram instaladas com um compasso de 3 m x 3 m, em sistema de Cordão Simples Ascendente- CSA. A poda é efetuada em sistema Guyot unilateral. A fertilização e o controlo de pragas e doenças seguem as normas de produção integrada.



Figura 6-Vista aérea da Quinta do Corvo e do local de amostragem. Retirado de Google Earth (2017)

### 3.2. Condições Experimentais

O presente estudo pretendeu avaliar o efeito da aplicação de MeJA em videiras saudáveis e infetadas com FD, ao nível fisiológico e bioquímico (objetivo 1) e genético (objetivo 2). Deste modo, foram selecionadas quatro plantas saudáveis e quatro plantas infetadas para cada grupo experimental. As amostras após serem recolhidas foram acondicionadas de imediato em azoto líquido. No laboratório, o material vegetal foi

macerado e armazenado -80 °C. Neste trabalho, a identificação dos estados fenológicos da videira foi baseada na escala fenológica de Baggiolini (Anexo I), considerando-se a floração e o pintor os estados fenológicos de referência para a descrição e explicação do trabalho experimental.

### Objetivo 1

Uma semana antes da floração (2 de junho de 2016), equivalente ao estágio fenológico H na escala de Baggiolini (botões florais separados), as plantas foram tratadas através de pulverização foliar com solvente (etanol a 2,5 %), 12,5 mM e 25 mM de MeJA. Doze semanas após os tratamentos, ao pintor (25 de agosto de 2016), foram recolhidas cinco folhas por cada planta de cada tratamento (Figura 7A).

### Objetivo 2

Para o estudo da expressão dos genes pretendeu-se perceber se existem diferenças na resposta genética entre plantas que sofreram uma única aplicação de MeJA na fase do pintor (25 de agosto de 2016) (Figura 7B, painel superior), e plantas que sofreram duas aplicações de MeJA, a primeira ao estado fenológico H (botões florais separados), antes da floração (2 de junho de 2016), e a segunda ao pintor (Figura 7B, painel inferior). Assim, antes da floração, as plantas foram tratadas através de pulverização foliar com solvente (etanol a 2,5 %), 12,5 mM e 25 mM de MeJA, tendo-se deixado quatro plantas intactas sem qualquer aplicação. Estas últimas foram tratadas exclusivamente ao pintor, com 25 mM de MeJA e recolheram-se cinco folhas por cada planta de cada tratamento, antes (T0P), 6h (T6P) e 24h (T24P) após a aplicação. Para as restantes plantas, passadas doze semanas, ao pintor, recolheram-se tecidos (T0), e fez-se a segunda aplicação de MeJA. Passadas 6h (T6) e 24h (T24) foi efetuada uma nova recolha de material biológico.

A



**B**

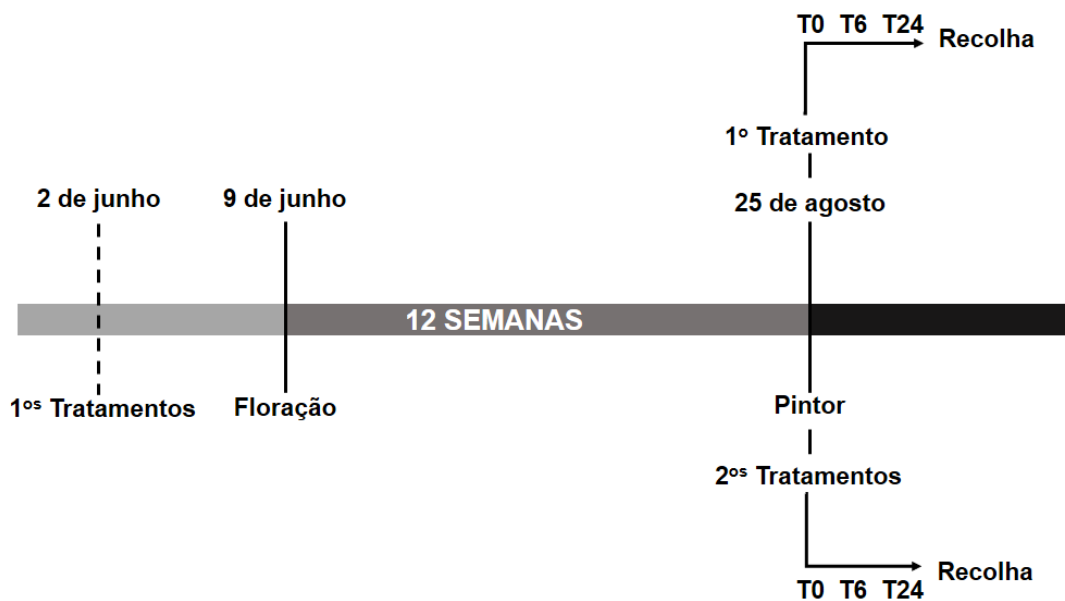


Figura 7- Representação esquemática de aplicação dos tratamentos para as análises fisiológicas e bioquímicas (objetivo 1) (A); e genéticas (objetivo 2) (B).

### 3.3. Metodologia Analítica

#### 3.3.1. Quantificação do Conteúdo em Água

A quantificação do conteúdo de água foi efetuada com base no protocolo de Tan et al., (2005). O material vegetal foi macerado com azoto líquido até obtenção de um pó homogêneo. Pesou-se 1,0 g de cada amostra para tubos individuais com a tampa perfurada. Colocou-se as amostras no liofilizador durante sete dias. Posteriormente, registou-se o peso seco das amostras. Cálculo utilizado para a quantificação do conteúdo de água:

$$\text{Conteúdo de água (\%)} = \frac{(\text{peso fresco} - \text{peso seco})}{\text{peso fresco}} \times 100\%$$

#### 3.3.2. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada com base no protocolo de Li (2000). Adicionou-se 500 µl de ácido tricloroacético a 0,1% a 0,1 g de material vegetal, em seguida colocaram-se as amostras no vortex durante 90 seg para homogeneização das mesmas. As amostras foram centrifugadas por um período de 5 min a 10200 rpm (rotação por minuto) e o sobrenadante foi recuperado. A 250 µl de sobrenadante foi adicionado 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,5% em ácido tricloroacético a 20%. De seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C durante 30 min, sendo posteriormente

colocadas em gelo para parar a reação. Subsequentemente, foram centrifugadas por um período de 10 min a 10200 rpm. A absorvância das amostras foi medida com o nanofotômetro (IMPLEN, Alemanha) a  $\lambda=532$  e  $\lambda=600$  nm. A peroxidação é avaliada pela quantidade de malondialdeído produzido (MDA). Cálculo utilizado para determinar a concentração de MDA:

$$\text{MDA} = [(Abs_{532} - Abs_{600}) \times \text{volume}] / (c = 155\text{mM/cm} \times \text{biomassa})$$

### 3.3.3. Quantificação de Pigmentos Foliare

A quantificação de pigmentos foliares foi efetuada com base no protocolo de Sims e Gamon (2002). Pesou-se 0,1 g de cada amostra e adicionou-se 10 ml de uma solução de acetona/ Tris *buffer* (80:20 vol: vol, pH=7,8). As amostras incubaram durante 72h a 4 °C, no escuro. A concentração de pigmentos fotossintéticos nos extratos foi medida com nanofotômetro a  $\lambda= 470$  nm,  $\lambda= 537$  nm,  $\lambda= 647$  nm e  $\lambda= 663$  nm. Cálculo utilizado para a quantificação de pigmentos foliares:

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663}$$

$$\text{Chl}_a = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$\text{Chl}_b = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{A_{470} - (17,1 \times (\text{Chl}_a + \text{Chl}_b)) - 9,479 \times \text{Antocianinas}}{119,26}$$

### 3.3.4. Quantificação de Saponinas

A quantificação de saponinas foi determinada com base no protocolo de Patel et al. (2012). Pesou-se 0,25 g de amostra macerada e adicionou-se 5 ml de metanol a 80%. Após uma incubação de 12h a 50 °C, o sobrenadante foi recuperado. A 100  $\mu$ l do sobrenadante foi adicionado 100  $\mu$ l de solução de vanilina a 8% (w/v) e 1 ml de ácido sulfúrico a 72% (w/v), as amostras foram colocadas em gelo. De seguida, estas estiveram em incubação durante 10 min num banho a 60 °C. A absorvância das amostras foi medida com o nanofotômetro a um  $\lambda= 535$  nm. A quantificação de saponinas foi determinada através de uma curva de calibração de diosgenina (Sigma Aldrich, EUA) (0 – 1 mg/ml).

### 3.3.5. Quantificação de Prolina

A quantificação de prolina foi realizada com base no método de Bates et al., (1973). Para cada condição, a 0,5 g de amostra foi adicionado 10 ml de ácido sulfossalicílico a 3%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2200 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi recuperado. A 200  $\mu$ l de sobrenadante foram adicionados 200  $\mu$ l de

ácido acético glacial e 200 µl de ninidrina, seguindo-se um período de incubação de 1h a 96 °C. De seguida, foi adicionado 1 ml de tolueno e as amostras foram colocadas no vortex durante 20 seg. O sobrenadante cor de rosa foi recuperado, e a absorvância das amostras foi medida com o nanofotómetro a um  $\lambda = 520$  nm. A quantificação de prolina foi determinada através de uma curva de calibração de DL-prolina (Sigma Aldrich, China) (0 – 10 ml/l).

### 3.3.6. Quantificação de Lenhina

A quantificação de lenhina foi efetuada com base no protocolo de Fukushima et al., (2001). As amostras previamente homogeneizadas, foram liofilizadas durante um período de 72h. Posteriormente, transferiu-se 0,1 g do liofilizado para tubos *Falcon* de 15 ml e adicionou-se 5 ml de metanol, as amostras permaneceram cerca 24h no escuro à temperatura ambiente a extrair. De seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (armazenado a -20°C para a quantificação de fenólicos), adicionou-se 5 ml de água desionizada, as amostras extraíram durante 24h no escuro à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 ml de acetona, repousando 24h no escuro à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, e adicionou-se 5 ml de hexano permanecendo cerca de 24h no escuro à temperatura ambiente. As amostras secaram a 60 °C durante 72h. Pesou-se aproximadamente 10 mg de amostra e adicionou-se 1 ml de brometo de acetila 12,5% (em ácido acético). As amostras foram colocadas a digerir a 50°C por 2h numa incubadora orbital a 200 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas durante 5 min a 13300 rpm. Recolheu-se 100 µl de sobrenadante para um novo tubo que continha 200 µl de ácido acético e 150 µl de NaOH 0,3 M. De seguida, adicionou-se 50 µl de cloridrato de hidroxilamina 0,5 M e 500 µl de ácido acético, e a absorvância das amostras foi medida com o nanofotómetro a um  $\lambda = 280$  nm. A quantificação de lenhina foi determinada através de uma curva de calibração de lenhina (Sigma Aldrich, EUA) (0 – 250 mg/l).

### 3.3.7. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

A quantificação de compostos fenólicos foi determinada pelo método Azevedo et al. (2010). A 0,1 g de material vegetal foi adicionada 5 ml de metanol. De seguida, as amostras foram incubadas durante 24h no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, estas foram centrifugadas e o sobrenadante foi recuperado. Num novo tubo, foram adicionados 100 µl de sobrenadante, a 5 ml de água ultrapura e a 500 µl de reagente *Follin-Denis'*, seguindo-se uma incubação de 5 min antes da adição de 1,5 ml de carbonato de sódio 20% (w/v). Após um período de 2h de incubação no escuro, foram



adicionados 2,9 ml de água ultrapura. A absorvância das amostras foi medida com o nanofotômetro a um  $\lambda = 760$  nm. A quantificação de compostos solúveis totais foi determinada através de uma curva de calibração de quercetina (Sigma Aldrich, EUA) (0 -250 mg/l).

### 3.3.8. Quantificação de Flavonóides

A quantificação do conteúdo de flavonóides foi realizada de acordo com o método de Chang et al. (2002). Para cada amostra, foram dissolvidas 10 mg de material vegetal em 0,5 ml de etanol a 80%. De seguida, foi adicionado 1,5 mL de etanol a 95%, 0,1 mL de cloreto de alumínio a 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água destilada. As amostras incubaram durante 30 min à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi medida com o nanofotômetro a um  $\lambda = 415$  nm. A determinação do conteúdo de flavonóides totais foi determinada através de uma curva de calibração de quercetina (Sigma Aldrich, EUA) (0 – 250 mg/l).

### 3.4. Solução de Metil Jasmonato (MeJA)

Preparou-se uma solução inicial (solução-mãe) de 100 mM de MeJA, adicionou-se 22,92 ml de MeJA, 25 ml de etanol absoluto (2,5%), 1 ml de Tween 20 (Sigma Aldrich, EUA) e 951,08 ml de água destilada. A solução-mãe de MeJA foi diluída, obtendo-se duas soluções de trabalho à concentração de 12,5 mM e 25 mM.

### 3.5. Expressão de Genes

#### 3.5.1. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada de acordo com o método de Le Provost et al. (2007). Macerou-se o material vegetal com azoto líquido até à obtenção de um pó homogéneo, e pesou-se 100-200 mg de cada amostra para se proceder à extração de RNA. Adicionou-se 1 ml de *buffer* de extração (pré-aquecido a 65°C, em caso de precipitação) com  $\beta$ -mercaptoetanol a 2%. Posteriormente, colocou-se as amostras no vortex durante 15 seg para homogeneização das mesmas, e procedeu-se a um período de incubação a 65 °C durante 10 min, durante o qual se inverteu os tubos 3 vezes. De seguida, juntou-se 1 ml de CIA, agitou-se vigorosamente, e centrifugou-se a 9900 rpm durante 10 min, à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 800  $\mu$ l de CIA, e centrifugou-se novamente, a 9900 rpm durante 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 125  $\mu$ l de cloreto de lítio a 10M, e incubaram-se as amostras durante a noite

a 4°C. Posteriormente, centrifugou-se a 9900 rpm durante 10 min, a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente, invertendo os tubos. Ressuspendeu-se o *pellet* com 500 µl STE (*Sodium Chloride-Tris-EDTA*) (pré aquecido a 65°C – em caso de precipitação) e juntou-se 450 µl de CIA. De seguida, centrifugou-se a 9500 g durante 15 min, a 4 °C e transferiu-se o sobrenadante para um *ependorf* de 2 ml. Colocou-se as amostras em gelo. Para extrair o RNA residual, adicionou-se 150 µl de STE, e procedeu-se a uma centrifugação a 9900 rpm durante 10 min a 4° C. Foram recuperados até 100 µl e adicionados ao mesmo tubo mantido em gelo. Adicionou-se 100 µl de NaCl a 5M e 1,5 ml de etanol absoluto (-20°C), agitou-se vigorosamente e, incubou-se durante 2h a -20°C ou durante 30 min a -80 °C. Centrifugou-se a 9900 rpm durante 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 400 µl de etanol a 70% (-20°C), homogeneizou-se gentilmente. Novamente, centrifugou-se a 9900 rpm durante 10 min a 4° C. Ressuspendeu-se o *pellet* em 30 µl DEPC-Water (Sigma). O RNA foi purificado com Kit Turbo DNase (Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante e foi posteriormente quantificado no nanofotómetro.

### 3.5.2. Síntese de cDNA/ Diluição de cDNA

A síntese de cDNA foi efetuada com o Kit de cDNA iScript (BioRad) no termociclador (VWR Doppio, Bélgica), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi efetuada uma diluição de 100 vezes de cDNA, visto ser a diluição mais eficiente para a quantificação da expressão genética.

### 3.5.3. PCR quantitativo (qPCR)

O protocolo de PCR foi efetuado recorrendo ao kit NZY Green Master Mix Taq 2x (Nzytech, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas a um processo de desnaturação inicial a 95°C durante 120 seg; 25 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg; emparelhamento durante 30 seg a 55°C e, extensão a 72 °C durante 60 seg; processo de extensão final a 72°C durante 5 seg.

### 3.5.4. *Primers* para o estudo de expressão de genes

Os *primers* utilizados para o estudo da expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas PR e, processos de obtenção de energia e degradação de proteínas foram selecionados a partir dos estudos desenvolvidos por Margaria e Palmano (2011) e Belhadj et al. (2006) (Tabela 2 e 3). Os *primers* utilizados para o estudo da expressão

de genes envolvidos na via dos fenilpropanoides foram selecionados a partir do estudo desenvolvido por Belhadj et al. (2008) (Tabela 4).

Tabela 2- *Primers* para os genes envolvidos na síntese proteínas relacionadas com patogenicidade (PR)

<b>Primer Sequence 5'-3'</b>		
<b>Thau I</b>	Forward	TGCCAGGGCTACGGTTCA
	Reverse	AGTCGAGGTTATTGGGCTGGTT
<b>Thau II</b>	Forward	CTTCACCCCCAGCTATGCA
	Reverse	GCCGCAGCCCAAACC
<b>Osm</b>	Forward	CTATTCTTCACCTCCAGCTATGCA
	Reverse	ACTGCCGCAGCCCAAAC
<b>PBSP</b>	Forward	GCGTCCGATTCACAAATGAA
	Reverse	CATATGAAGTCGGTGGCAGATACT
<b>CHIT4c</b>	Forward	GGATAGCATTGGGTTTGA
	Reverse	ATAAGAAAACCCCGGAAC
<b>PIN</b>	Forward	TGGCATCTGAATGTGAAG
	Reverse	AGGCTGGGTGAATAACA
<b>PGIP</b>	Forward	CTCCTTCGGAAAATTCG
	Reverse	AGCACCGATTGTGAAAGT
<b>GLU</b>	Forward	TGTGAGGGGTTATTTGGA
	Reverse	ATCCCAAGGTTTTTCTCC

Tabela 3- *Primers* para os genes envolvidos em processos de obtenção de energia e de degradação de proteínas

<b>Primer Sequence 5'-3'</b>		
<b>Rubisco</b>	Forward	GCTCTTGGAGATGCGAACGT
<b>Activase</b>	Reverse	GGGCTGCCTTGCCATAAA
<b>Prot.α 5</b>	Forward	GCACGAGTTGAAACTCAGAATCATAG
	Reverse	GCAGGGCAAGGTCACAAAGA

Tabela 4- *Primers* para os genes envolvidos na via dos fenilpropanoides

<b>Primer Sequence 5'-3'</b>		
<b>STS</b>	Forward	ACCATCAAGGGTGCTATG
	Reverse	TGCCTAGTTGCTTCCAAT
<b>PAL</b>	Forward	GAGTCATGCCACACACGT
	Reverse	CGTCATCACTTCAGCAA

### 3.6. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, San Diego, CA, EUA*). Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (EP). A análise da variância bidimensional (*two-way ANOVA*) seguida do teste de Tukey foi realizada com vista a comparar a atividade dos metabolitos de defesa e expressão de genes em plantas saudáveis e infetadas, as quais foram sujeitas à aplicação do elicitador MeJA a diferentes concentrações. O nível de significância foi estabelecido para um valor de  $P$  inferior a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

A análise da expressão de genes foi feita usando o programa MeV 4.9.

## 4. Resultados e Discussão

Como referido na seção do Material e Métodos, o material biológico utilizado no presente estudo, folhas de videira cv. Loureiro saudáveis e infetadas, foi recolhido em agosto de 2016 na Quinta do Corvo.

O verão do ano de 2016 (junho, julho e agosto) na Região Demarcada dos Vinhos Verdes, foi caracterizado por períodos irregulares de elevada pluviosidade e por valores de temperatura média. Estes fatores no seu conjunto influenciaram o surgimento dos sintomas típicos da infeção por FD, uma vez que a sintomatologia é mais evidente no verão, aquando da subida das temperaturas. Por conseguinte, durante o momento da amostragem, as videiras infetadas com FD ainda não apresentavam os sintomas fenotípicos típicos da doença. No entanto, era possível identificar-se uma ligeira alteração da coloração das folhas e o aborto dos cachos (Figura 8A e 8B, respetivamente).

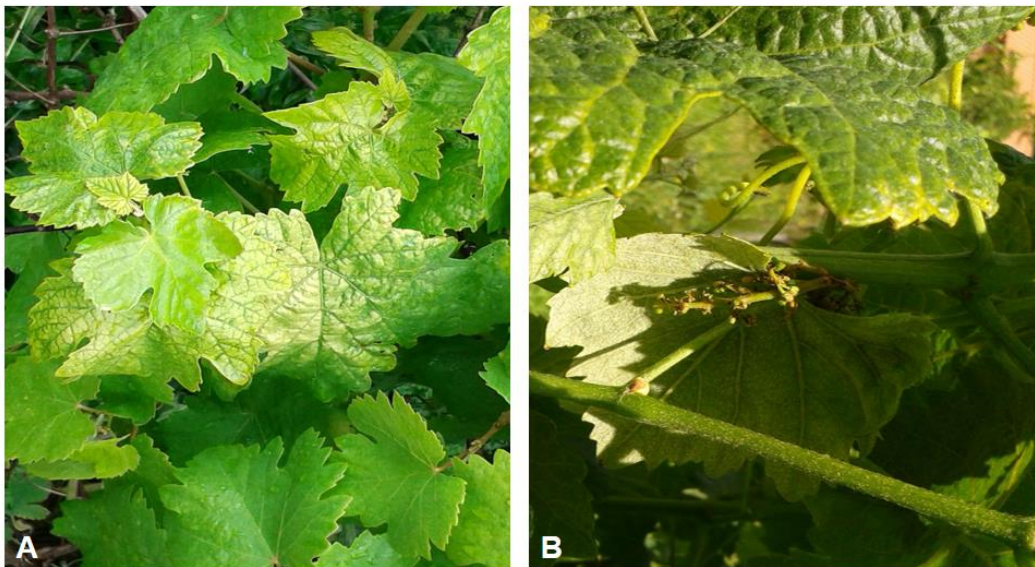


Figura 8 - Sintomatologia presente no momento da amostragem: alteração da pigmentação das folhas (A); aborto dos cachos (B).

### 4.1. Análise Fisiológica e Bioquímica

#### 4.1.1. Conteúdo em Água

As plantas infetadas com FD estão descritas como sendo menos desenvolvidas e em senescência mais precocemente (Castro, 2015; Pinto, 2016). Neste sentido, com o objetivo de quantificar a perda de H<sub>2</sub>O provocada pela doença e avaliar o efeito do MeJA na mesma, efetuou-se a análise de conteúdo em água. Contrariamente ao esperado, as plantas FD+ não apresentaram diferenças significativas no conteúdo em água em relação às plantas FD- (Figura 9). Também se verifica que a aplicação de MeJA a

diferentes concentrações não influenciou o teor em água nas mesmas. Estes resultados são concordantes com os do estudo de Bidabadi et al. (2013), em que se verificou que o tratamento com MeJA não provocou diferenças significativas no conteúdo de água em videira.

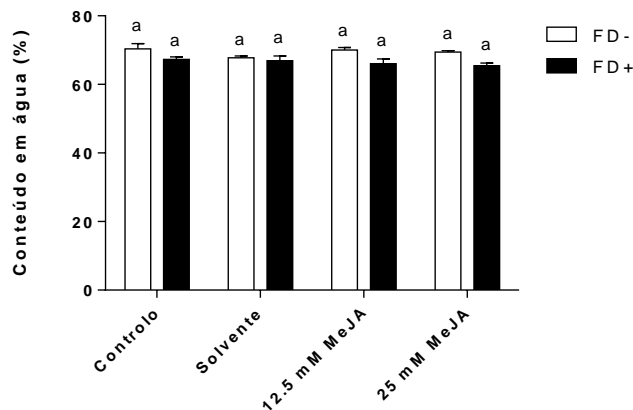


Figura 9- Percentagem de conteúdo em água em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica da membrana celular está geralmente associada a condições de stress, envelhecimento celular e senescência. A peroxidação resulta na formação e propagação de radicais lipídicos, e seu o produto final mais abundante é o malondialdeído (MDA), sendo este utilizado como marcador do stress oxidativo celular (Bhattacharjee, 2014). Assim, no sentido de quantificar o dano oxidativo nas videiras provocado pela infeção de FD e o efeito do MeJA no mesmo, foi efetuada a análise de peroxidação lipídica.

Através da análise da Figura 10, verifica-se que existe um aumento de cerca de 14% da concentração de MDA, em plantas FD+ em relação a plantas FD-, sem tratamento (controlo), embora este não seja considerado estatisticamente significativo. Verificando-se também que a aplicação de solvente não provocou alterações significativas entre plantas saudáveis e infetadas. Um estudo realizado em cultivares de macieira infetadas com fitoplasma revelou que a concentração de MDA varia consoante a progressão da sintomatologia por parte da planta (Musseti et al., 2004). Nesse estudo, quanto mais evidentes os sintomas, mais significativa foi a diferença observada na concentração de MDA entre plantas infetadas e saudáveis.

De acordo com o estudo efetuado por Bidabadi et al. (2013) em quatro cultivares de videira (Asgari, Shahani, Ghermez Ghazvin e Yaghuti Sefid), seria expectável que a aplicação de MeJA aumentasse significativamente a acumulação de MDA. No entanto,

mediante a análise dos resultados dos tratamentos 12,5 mM e 25 mM de MeJA não se verificaram alterações significativas entre plantas saudáveis e infetadas, nem entre os tratamentos. Este resultado reflete a reduzida diferença na sintomatologia entre as plantas FD+ e FD- aquando da amostragem, podendo explicar a ausência de efeito significativo na concentração de MDA.

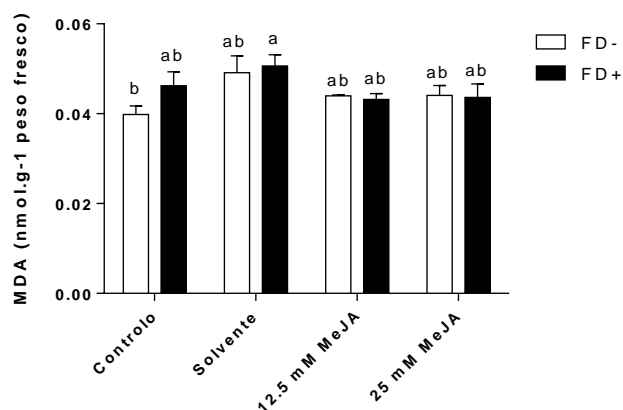


Figura 10- Concentração de MDA em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

### 4.1.3. Pigmentos Foliare

As clorofilas e os carotenoides são pigmentos fotossintéticos naturais presentes nas plantas e encontram-se essencialmente nos cloroplastos e noutros tecidos vegetais (Huang et al., 2017). A par com estes, as plantas também possuem outro tipo de pigmentos, as antocianinas, que pertencem ao grupo dos flavonóides (Delgado-Vargas et al., 2000). Dependendo da sua abundância e/ou distribuição, os pigmentos influenciam a cor dos tecidos vegetais e podem desempenhar funções antioxidantes, de foto proteção e também de defesa contra stresses abióticos e bióticos (Delgado-Vargas et al., 2000).

No presente estudo, as plantas controlo infetadas demonstraram uma tendência para o aumento da concentração dos pigmentos foliares em relação às plantas controlo saudáveis, sendo que este comportamento foi idêntico nas plantas tratadas com solvente e 12,5 mM de MeJA (Figura 11), não demonstrando diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Um dos principais sintomas da infeção com FD é a alteração da pigmentação das folhas em consequência da inibição da sua biossíntese e redução da produção de assimilados fotossintéticos (Bertaccini & Duduk, 2009; Bertamini et al., 2002). Assim, relativamente ao efeito da doença na concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas totais e carotenóides), verificou-se que não houve diferenças significativas entre FD- e FD+, exceto em plantas tratadas com 25 mM de MeJA. Observou-se

também que não houve influência da aplicação do solvente. Tendo-se sim, observado que as plantas FD- tratadas com 25 mM de MeJA apresentaram um aumento significativo não só em relação as plantas FD+ do mesmo tratamento (52%), como também em relação às plantas FD- controlo (40%) e FD- tratadas com solvente (46%) (Figura 11A), FD+ tratadas com 25 mM de MeJA (51%), FD- controlo (39%), FD-solvente (46%) e FD- tratadas com 12,5 mM de MeJA (40%) para os carotenóides (Figura 11B). Relativamente às antocianinas, foi observado um efeito significativo da aplicação de MeJA ( $P= 0,0003$ ), onde as plantas FD- tratadas com 25 mM demonstraram um aumento significativo em relação a todos os tratamentos (Figura 11C). Assim, pode-se constatar que o tratamento com 25 mM de MeJA induziu a produção destes compostos nas plantas saudáveis, tal como foi reportado por Bidabadi et al. (2013), mas não em plantas infetadas com fitoplasma como foi descrito em Himeno et al. (2014).

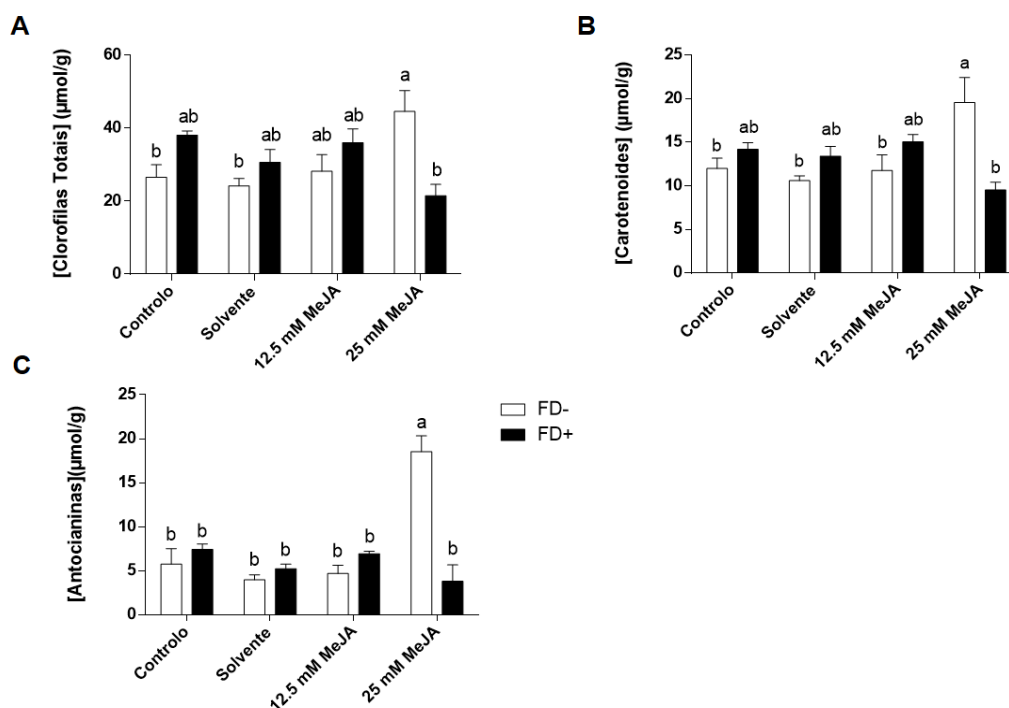


Figura 11- Concentração de clorofilas totais (A), carotenóides (B) e antocianinas (C) em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



#### 4.1.4. Saponinas

Pelo seu papel nos mecanismos de resistência contra stress biótico, analisou-se a concentração de saponinas nas folhas das plantas dos diferentes tratamentos (Figura 12). Neste metabolito, a infecção com FD conduziu a uma diminuição de cerca de 54% na sua acumulação em relação às plantas FD- sem tratamento de MeJA (controlo).

Se, por um lado, nas plantas saudáveis não se observou nenhuma diferença em consequência da aplicação de solvente ou MeJA, por outro lado, o tratamento com estes compostos nas plantas FD+ provocou alterações significativas no teor de saponinas. Assim, a aplicação de solvente *per se* em plantas FD+ já induziu a um aumento de cerca de 55% da concentração de saponinas em relação as plantas FD+ sem tratamento de MeJA (controlo). Observou-se ainda que os tratamentos com 12,5 mM e 25 mM de MeJA aumentaram a acumulação deste metabolito em cerca de 68% e de 51% em plantas FD+ em comparação com plantas FD+ sem tratamento (controlo) de MeJA, respectivamente. Este resultado indica que a aplicação de MeJA potencialmente melhorou a capacidade de defesa destas plantas, uma vez que estas moléculas estão frequentemente presentes em maiores concentrações em folhas de plantas saudáveis (Osbourn, 1996).

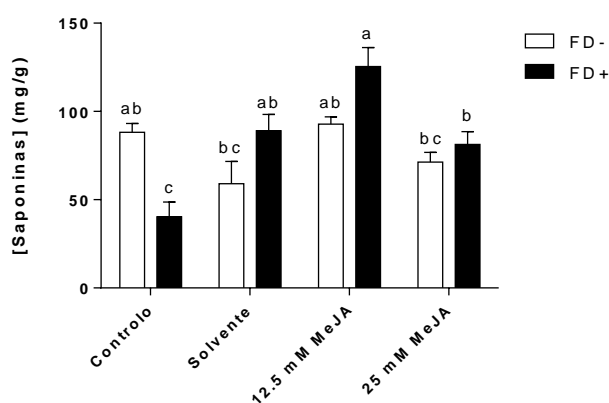


Figura 12- Concentração de saponinas em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.5. Prolina

Por forma avaliar de que modo a FD afeta a atividade osmorreguladora nas plantas e como o MeJA poderia influenciar a mesma, avaliou-se a concentração de prolina após aplicação de diferentes tratamentos. Os resultados da Figura 13, demonstram que, tal como observado nos pigmentos fotossintéticos, não houve efeito significativo da FD na síntese de prolina ( $P = 0,1489$ ). Por outro lado, verificou-se uma influência significativa da aplicação do solvente em plantas FD+. Como tal, a concentração de prolina

aumentou de cerca de 57% em relação às plantas do grupo controlo. No que respeita ao efeito da aplicação de MeJA na produção deste metabolito apenas o tratamento com 25 mM de MeJA induziu a um aumento de cerca de 51% na acumulação de prolina em plantas FD<sup>+</sup> em comparação com plantas controlo ( $P < 0,05$ ).

Num estudo realizado em videiras saudáveis a produção de prolina diminuiu após a aplicação de 4,5 mM de MeJA (Bidabadi et al., 2013). No entanto noutro estudo, plantas de soja em condições de alta salinidade aumentaram a produção de prolina após o tratamento com 0,02 mM e 0,03 mM de MeJA (Yoon et al., 2009).

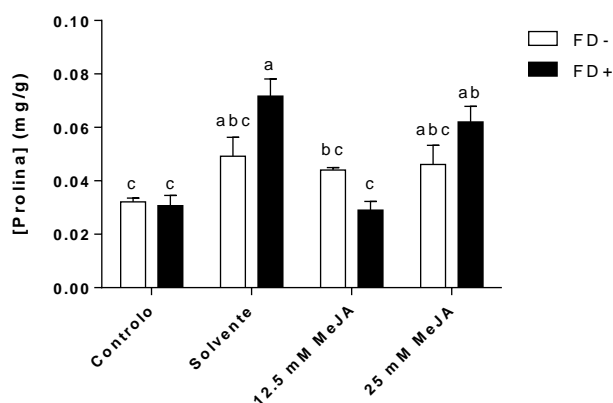


Figura 13- Concentração de prolina em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavecência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.6. Lenhina

A biossíntese de lenhina está associada à proteção e suporte mecânico das plantas em resposta ao stress biótico (Moura et al., 2010). Mediante análise da Figura 14 é possível observar um aumento, embora não significativo, da concentração de lenhina, em plantas FD<sup>+</sup> que receberam solvente, em relação às plantas FD<sup>-</sup>. No entanto, constatou-se que não houve qualquer influência quer da doença, quer da aplicação de MeJA na síntese de lenhina. Estes resultados são em parte contraditórios em relação à literatura, que reporta uma diminuição da biossíntese deste metabolito em videiras infetadas com Bois Noir (Punelli et al., 2016). Por outro lado, Franceschi et al. (2002) verificaram, à semelhança dos resultados aqui apresentados, a ausência de alterações nos perfis de acumulação de lenhina em *Picea abies*, após o tratamento com 100 mM de MeJA.

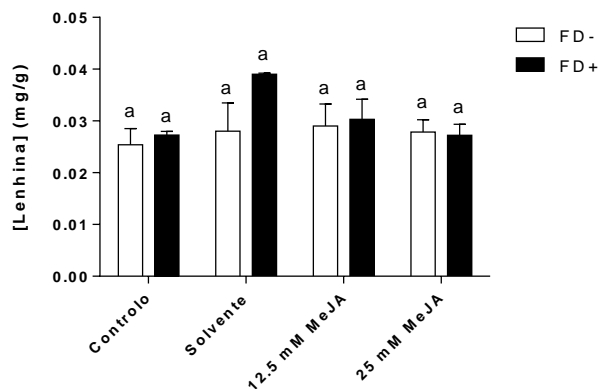


Figura 14 - Concentração de lenhina em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.7. Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos desempenham uma importante função na resposta defensiva contra a infeção por agentes patogénicos devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Ruiz-García et al., 2012). Assim, com o objetivo de avaliar a influência destes compostos no combate à FD, bem como avaliar o efeito de MeJA na biossíntese destes metabolitos, foi efetuada uma análise de quantificação de compostos fenólicos. Perante análise da Figura 15, verificou-se que não existem diferenças significativas entre plantas FD- e plantas FD+ nos grupos sem tratamento (controlo) e que a aplicação de MeJA não influenciou significativamente a concentração de fenólicos, nem em plantas doentes, nem em plantas saudáveis. No entanto, observa-se um aumento de cerca de 15% da concentração, embora não significativo, destes compostos em plantas FD- comparativamente às FD+ em consequência da aplicação de 12,5 mM de MeJA. Este resultado é concordante com o obtido num estudo elaborado por Ruiz-García et al. (2012) em que se verificou que a aplicação de 10 mM de MeJA induz o aumento dos compostos fenólicos em plantas de videira cv. Monastrell.

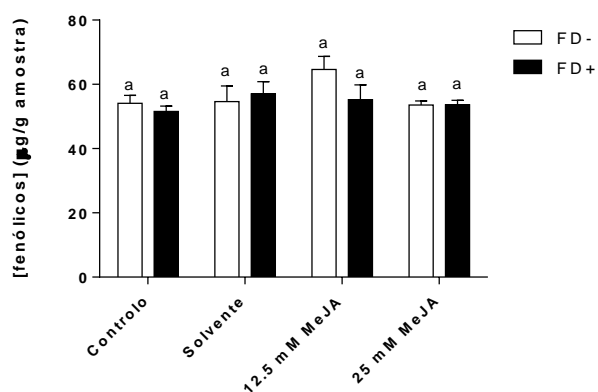


Figura 15- Concentração de compostos fenólicos em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.8. Flavonóides

A acumulação de flavonóides em videira foi reportada como uma possível consequência fisiológica provocada pela infeção da FD (Margaria et al., 2014). Assim, por forma a estudar a síntese de flavonóides em resposta à infeção por FD e como o MeJA pode influenciar a mesma, avaliou-se a produção destes metabolitos após aplicação de diferentes tratamentos. Ao contrário do descrito na bibliografia, observou-se uma diminuição da concentração de flavonóides de cerca de 26% nas plantas controlo doentes (FD+) em relação às plantas saudáveis (FD-) (Figura 16). Também se constatou que a aplicação de solvente induziu um aumento de cerca de 15% da acumulação de flavonóides em plantas FD+ em relação às plantas FD-, ainda que este não seja significativo. Paralelamente, não se registaram diferenças significativas entre as plantas FD+ e FD- tratadas com 12,5 mM e 25 mM de MeJA. Estes resultados afastam-se dos obtidos no estudo de Ruiz-García et al. (2012) em que se verificou um aumento do conteúdo de flavonoides após aplicação de 10 mM de MeJA.

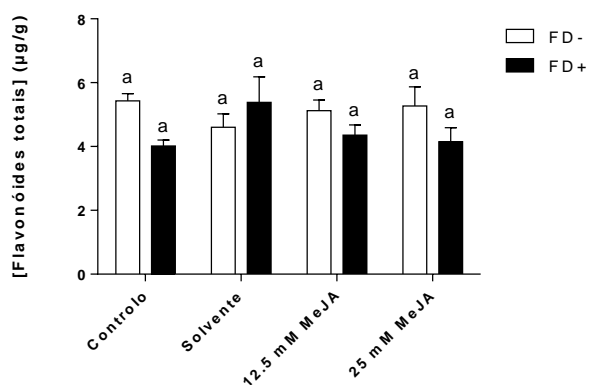


Figura 16- Concentração de flavonóides totais em folhas de videiras saudáveis (FD-) e infetadas com Flavescência dourada (FD+), sem MeJA (controlo), tratadas com solvente, 12,5 mM ou 25 mM de MeJA. As barras representam a média de quatro plantas  $\pm$  EP. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

## 4.2. Análise da Expressão de Genes

A indução da expressão de genes de defesa é uma resposta frequente das plantas em situações de stress biótico, como por exemplo o ataque e infecção de agentes patogênicos. Assim, com vista a estudar as bases moleculares da resposta da planta à infecção, bem como avaliar o efeito do elicitador MeJA na indução de mecanismos de defesa, selecionou-se um conjunto de 12 genes de interesse que: (i) codificam proteínas PR (Thau I- *Thaumatin I*, Thau II- *Thaumatin II*, Osmot- *Osmotin-like protein*, PBSP- *Plant Basic Secretory Protein*, CHIT4c- *Acidic Class IV Chitinase*, PIN- *Inhibitors of Serine Protease*, PGIP- *Polygalacturonase- inhibiting Protein* e GLU-  $\beta$ -1,3- *glucanes*), (ii) estão envolvidos em processos de obtenção de energia, como a fotossíntese (RubAct- *Rubisco Activase AAA+*) e (iii) de degradação de proteínas (Prot.  $\alpha$ 5- *Proteasome  $\alpha$ 5 subunit*), e (iv) que codificam enzimas envolvidas na via dos fenilpropanóides (STS- *Silbene Synthase* e PAL- *Phenylalanina Ammonia Lyase*) (Margaria & Palmano, 2011; Belhadj et al., 2006; Belhabj et al., 2008).

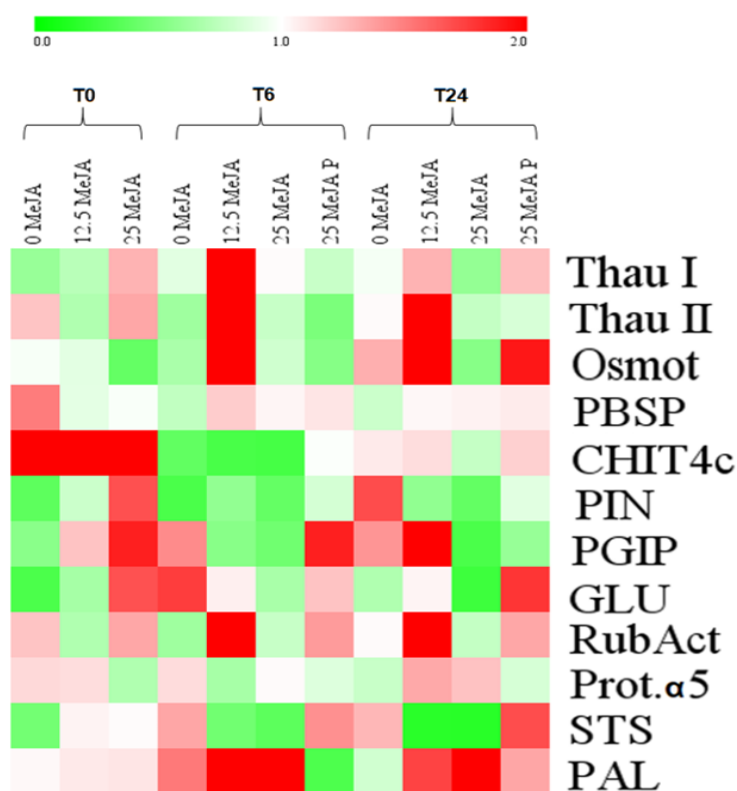


Figura 17- Heat map, obtido por RT-PCR, referente à expressão de genes após aplicação de 0 (solvente), 12,5 e 25 mM de MeJA, uma semana antes da floração, e uma re-aplicação ao pintor; 25 MeJA P, tratamento exclusivo ao pintor com 25 mM de MeJA. A recolha das amostras foi efetuada antes da aplicação (T0), 6h e 24h após a aplicação, (T6) e (T24) respetivamente. (verde, menor expressão, vermelho, maior expressão). Os resultados expressos foram calculados através do rácio FD+/FD-

Mediante a análise da Figura 17, e olhando primeiramente para as plantas que sofreram uma única aplicação de MeJA ao pintor (T6 e T24, 25 MeJA P), observou-se que 6h após o tratamento com 25 mM de MeJA induziu a expressão dos genes que codificam PBSP, PGIP, GLU, RubAct e STS, em plantas infetadas. Por outro lado, observou-se um aumento da expressão dos genes que codificam a Thau I, Osmot., CHIT4c, GLU, RubAct e PAL 24h após aplicação de 25 mM de MeJA em plantas FD+. Este comportamento poderá estar relacionado com uma potencial resposta específica das videiras elicítadas pelo MeJA contra o fitoplasma. Estes genes estão amplamente associados à defesa contra o stress biótico (Hren et al., 2009; Margaria et al., 2013; Yan et al., 2017), pelo que o aumento da sua expressão pode ser um indicativo do efeito positivo deste elicítador.

No que respeita às plantas elicítadas duas vezes observou-se um aumento da expressão dos genes que codificam a Thau I, Thau II e Osmot. 6h e 24h após reaplicação de 12,5 mM de MeJA em plantas FD+. Outros estudos também já haviam demonstrado este mesmo comportamento em plantas infectadas com FD (Margaria & Palmano, 2011), com Bois Noir (Albertazzi et al., 2009) e com *Onion Yellow*s (Zong & Shen, 2004). No entanto, em nenhum dos referidos estudos foi estudada a aplicação de qualquer tipo de elicítador que, no presente trabalho, teve um grande impacto na expressão genética. Tal como observado nos genes referidos acima, verificou-se uma sobreexpressão do gene que codifica a RubAct, o que não era expectável, visto que a infeção por FD reprime a expressão de genes fotossintéticos (Margaria & Palmano, 2011). Relativamente à aplicação de 25 mM de MeJA, em plantas FD+ re-elicítadas com esta concentração houve uma diminuição da expressão dos genes que codificam RubAct, Thau I, Thau II e Osmot. Em relação, ao gene que codifica a PBSP constatou-se que 6h após o tratamento com 12,5 mM de MeJA, a expressão deste gene em plantas FD+ pré-elicítadas aumentou, sendo que também se verificou um comportamento semelhante em plantas FD+ só elicítadas ao pintor, 6h e 24h depois do tratamento. Este resultado vai de encontro ao obtido num estudo no qual se verificou um aumento da expressão da PBSP em plantas infetadas com FD, sem tratamento (Margaria & Palmano, 2011). Este mesmo estudo, também descreveu que não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão do gene que codifica a Prot.  $\alpha 5$  e a infeção por FD. Assim, como sugerem os resultados aqui apresentados, também não se verificou diferenças significativas na expressão deste gene entre plantas FD+ e FD-, pré-elicítadas ou só tratadas ao pintor.

Estudos realizados em tecidos saudáveis de videira e uva demonstraram que a aplicação de MeJA induz o aumento da expressão dos genes que codificam STS, CHIT4c, PIN e PGIP (Belhadj et al., 2006; Belhadj et al., 2008; Martinez-Esteso et al.,

2009). De facto, neste trabalho, verificou-se em plantas FD-, um aumento da expressão destes genes 6h após a reaplicação de 12,5 mM e 25 mM de MeJA. Mais ainda, verificou-se que, em plantas FD+, houve um aumento do gene que codifica a PAL 6h e 24h após os tratamentos de 12,5 mM e de 25 mM de MeJA. Deste modo, é possível inferir que genes relacionados com a resposta de defesa, como a PAL, foram mais expressos em plantas infetadas com fitoplasma, tal como reportado por outros (Rusjan et al., 2012), e que a sua expressão é induzida pelo tratamento com MeJA, como também demonstrado noutro estudo realizado em folhas de videira (Belhadj et al., 2008) e no presente trabalho.

## 5. Conclusão

Neste trabalho, pretendeu-se: (i) comparar um conjunto de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas saudáveis e plantas infetadas com FD; (ii) avaliar o efeito indutor do MeJA nos mecanismos de defesa da videira contra à FD.

Considerando os resultados relativos às análises fisiológicas e bioquímicas, podemos concluir que a presença da doença e os tratamentos com MeJA não influenciaram de forma significativa o nível de stress oxidativo, conteúdo em água e produção de pigmentos foliares nas videiras. Concluiu-se que a infeção por FD afeta a síntese de saponinas, visto que se verificou uma diminuição da concentração deste metabolito em plantas infetadas. Por outro lado, os tratamentos com solvente e com 12,5 mM de MeJA induziram o aumento da produção de saponinas. Curiosamente, a aplicação de solvente *per se* fez disparar a produção de prolina não foi influenciada pela doença, visto que não houve diferenças na sua concentração entre plantas saudáveis e infetadas, sem tratamento. No entanto, observou-se que a síntese deste metabolito foi despoletada de forma evidente pela aplicação de solvente em plantas infetadas, não sendo tão demarcada nos tratamentos com diferentes concentrações de MeJA. Também se constatou, que de uma forma geral, as plantas saudáveis responderam de forma positiva à aplicação de 25 mM de MeJA, aumentando consideravelmente a concentração de pigmentos foliares em relação às plantas infetadas, e às plantas pertencentes a outros tratamentos. Por outro lado, constatou-se que tanto a infeção com FD como os tratamentos efetuados não induziram alterações significativas na síntese de lenhina, compostos fenólicos e flavonóides.

Na generalidade, houve uma grande variabilidade da expressão dos genes em estudo, sendo que se destacaram alguns padrões de expressão. Os genes que codificam RubAct, Thau I, Thau II e Osmotina, 6h e 24h após aplicação de 12,5 mM, apresentaram uma sobreexpressão seguida de uma de inibição 6h e 24h após o tratamento com 25 mM de MeJA, em plantas infetadas. Também se observou que 6h depois da aplicação de 12,5 mM e 25 mM de MeJA, ao pintor, provocou um aumento da expressão do gene que codifica PBSP em plantas infetadas. Também se constatou que 6h após aplicação de 12,5 mM de 25 mM de MeJA diminuiu a expressão dos genes que codificam STS, CHIT4c, PIN PGIP e GLU em plantas infetadas. Em contrapartida, verificou-se que a PAL foi expressa de forma evidente 6h e 24h após os tratamentos com diferentes concentrações de MeJA.

Em suma, após a conclusão deste estudo e perante a análise dos resultados obtidos, é possível concluir que o MeJA não desencadeia uma resposta eficiente no combate contra a FD, visto que a aplicação deste elicitador induziu o aumento da



produção de um número restrito de metabolitos de defesa em plantas infetadas. Como perspectivas futuras e complementares a este trabalho poder-se-ia realizar um estudo semelhante em que se utilize outros compostos com capacidade elicitora, como por exemplo o benzotiadiazol e o quitosano. Estudos anteriores concluíram que os elicitadores aumentam a síntese de metabolitos de defesa. Desta forma, seria também interessante estudar a resposta da síntese destes metabolitos em *time course*, ou seja, 4, 8 e 12 semanas após a aplicação do elicitor. De forma a obter uma visão geral da resposta da videira à FD, seria importante efetuar um estudo *non target* de transcriptômica, proteômica e metabolômica, de forma a identificar compostos característicos da infecção. Desta forma, poder-se-ia escolher alvos de interesse no estudo da influência da FD, bem como identificar novos mecanismos da resposta da videira.

## 6. Referências Bibliográficas

- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E., & Pecchioni, N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, *176*(6), 792-804.
- Al-Saady, N.A., Khan, A.J., Calari, A., Al-Subhi, A.M., & Bertaccini, A. (2008). 'Candidatus Phytoplasma omanense', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(2), 461–466.
- Andrade, A., Batista, V., Sofia, J., Almeida, J., & Manteigas, A. (2015). *Scaphoideus titanus* Ball. / *Flavescência Dourada* na DRAP Centro- FAN-FD 2015. Direção de Serviços de Desenvolvimento Agroalimentar, Rural e Licenciamento- Divisão de Apoio à Agricultura e Pescas.
- Angelini, E., Clair, D., Bertaccini, A., & Boudon-Padieu, E. (2001). Flavescence dorée in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, *40* (2), 79-86.
- Angelini, E., Negrisol, E., Clair, D., Borgo, M., & Boudon-Padieu, E. (2003). Phylogenetic relationships among Flavescence dorée strains and related phytoplasmas determined by heteroduplex mobility assay and sequence of ribosomal and Nonribosomal DNA. *Plant Pathology*, *52*(5), 663-672.
- Angelini, E., Bianchi, G.L., Filippin, L., Morassutti, C., & Borgo, M. (2007). A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, *68*(3), 613-622.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon- Padieu, E., & Foissac, X. (2007). Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(12), 4001-4010.
- Arocha, Y., López, M., Piñol, B., Fernández, M., Picornell, B., Almeida, R., Palenzuela, I., Wilson, M.R., & Jones, P. (2005). 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(6), 2451-2463.

- Azevedo, H., Dias, A., & Tavares, R.M. (2010). Analysis on the role of phenylpropanoid metabolism in the *Pinus pinaster*–*Botrytis cinerea* interaction. *Journal of Phytopathology* 158(9), 641-646.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, J.A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3682–3696.
- Bagnoli, B., & Gargani, E. (2011). Survey on *Scaphoideus titanus* egg distribution on grapevine. Integrated protection and production in viticulture IOBC/ wprs Bulletin Vol 67, pp. 233-237.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 75-92.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, J.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Belli, G., Bianco, P.A., & Conti, M. (2010). Grapevine Yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 303-326.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscalt, J., Corio-Costet, M.-F., & Mérillon, J.-M. (2006). Methyl Jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9119-9125.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S. & Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493-499.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Bertaccini, A., Arzone, A., Alma, A., & Vibio, M. (1993). Detection of mycoplasma-like organisms in *Scaphoideus titanus* Ball reared on flavescente dorée infected grapevine by dot hybridization using DNA probes. *Phytopathologia Mediterranea*, 32(1), 20-24.
- Bertaccini, A. & Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 355-378.

- Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F., & Grando, M.S. (2002). Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(6), 357-366.
- Bertin, S., Guglielmino, C. R., Karam, N., Gomulski, L. M., Malacrida, A. R., & Gasperi, G. (2007). Diffusion of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball in Europe: a consequence of human trading activity. *Genetica*, 131(3), 275-285.
- Bhattacharjee, S. (2014). Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress. *Current Science*, 107(11), 1811-1823.
- Bidabadi, S.S., Mehri, H., Ghobadi, C., Baninasab, B., & Afazel, M. (2013). Morphological, physiological and antioxidant responses of some Iranian grapevine cultivars to methyl jasmonate application. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16(4), 277-283.
- Borgo M., Angelini E., Bellotto D., 2006. *Vitis vinifera* sensitivity to grapevine yellows phytoplasmas in Italy. Proceedings XXIX Congrès Mondial de l'OIV., 34-35, CD 1-11.
- Borgo M., Filippin L., Bertazzon N., Angelini E., 2009. Detection of phytoplasmas associated with grapevine yellows in rootstocks. *Le progrès Agricole et Viticole HS*: 162-163.
- Bosco, D., & Mori, N. (2013). "Flavescence dorée" vector control in Italy. *Phytopathogenic Mollicutes*, 3(1), 40-43.
- Botti, S., & Bertaccini, A. (2006). FD-related phytoplasmas and their association with epidemic and non epidemic situations in Tuscany (Italy). In: XVth ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April, pp 163-164.
- Boudon-Padieu, E., Larrue, J., & Caudwell, A. (1989). ELISA and dot-blot detection of flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19(6), 357-364.
- Boudon-Padieu, E. (2000). Cicadelle vectrice de la flavescence dorée *Scaphoideus titanus* Ball, 1932. In: Stockel, J (eds.) *Ravageurs de la vigne*. Féret, Bordeaux, pp 110-120.
- Boudon-Padieu, E. (2002). Flavescence dorée of the grapevine: knowledge and new developments in epidemiology, etiology and diagnosis. In: Canova, A (eds.) *ATTI Giornate Fitopatologiche*, Baselga di Piné (Trento), Italy, 2002. pp 15-34.
- Boudon-Padieu, E., Béjat, A., Clair, A., Larrue, J., Borgo, M., Bertotto, L., & Angelini, E. (2003). Grapevine yellows: Comparison of different procedures for DNA

- extraction and amplification with PCR for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis*, 42(3), 141–149.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary Sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., & Bianco, P. A. (2011). Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in Grapevine Yellow-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 5018-5022.
- Bulgari, D., Bozkurt, A.I., Casati, P., Çağlayan, K., Quaglino, F., & Bianco, P.A. (2012). Endophytic bacterial community living in roots of healthy and “Candidatus *Phytoplasma mali*”- infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(4), 677-687.
- CABI (2017). Grapevine flavescence dorée phytoplasma (flavescence dorée of grapevine). Invasive Species Compendium. Acedido em 7 de julho de 2017 em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/26184> .
- Campbell, M.M., & Sederoff, R.R. (1996). Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiology*, 110(1), 3–13.
- Carle, P. & Moutous, G. (1965). Observations sur le mode de nutrition sur vigne de quatre espèces de cicadelles. *Ann Epiphyt*, 16, 333–354.
- Carton, Y., Sorensen, C., Smith, J. & Smith, E. (2007). Une coopération exemplaire entre entomologistes français et américains pendant la crise du Phylloxera en France (1868–1895). *Annales de la Société entomologique de France (N.S.): International Journal of Entomology*, 43(1), 103-125.
- Castro, S.C.A. (2015). Recursos genéticos e da aplicação de elicitadores no controlo da Flavescência Dourada da videira. Tese de Mestrado em Engenharia Agrónómica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 66pp.
- Caudwell, A., Brun, P., Fleury, A., & Larrue, J. (1972). Les traitements ovicides contre la cicadelle vectrice, *Scaphoideus littoralis* (Ball), leur intérêt dans la lutte contre la flavescence dorée en Corse et dans les autres régions. *Vignes Vins*, 21, 5–10.
- Caudwell, A., Larrue, J., Boudon-Padiou, E., & McLean, G. D. (1997). Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 21-25.
- Chalker-Scott, L., & Krahmer, R. L. (1989). Microscopic studies of tannin formation and distribution in plant tissues. In R. W. Hemingway, J. J. Karchesy, & S. J. Branham (Eds.), *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* (pp. 345-368). Boston, MA: Springer US.

- Chang, C.C, Yang, M.-H., Wen, H.-M, & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Chen, J.-Y., Wen, P.-F., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Zhan, J.-C., Li, J.-M., Wan, S.-B. & Huang, W.-D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72.
- Choudhary, N.L., Sairam, R.K., & Tyagi, A. (2005). Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 42(6), 366-370.
- Chuche, J., Thiéry, D., & Mazzoni, V. (2011). Do Scaphoideus titanus (Hemiptera: Cicadellidae) nymphs use vibrational communication? *Naturwissenschaften*, 98(7), 639-642.
- Chuche, J., & Thiéry, D. (2012). Egg incubation temperature differently affects female and male hatching dynamics and larval fitness in a leathopper. *Ecology and Evolution*, 2(4), 732-739.
- Chuche, J., & Thiéry, D. (2014). Biology and ecology of the Flavescence dorée vector Scaphoideus titanus: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 381-403.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 375-400.
- Crombie, W.M.L., & Crombie L. (1968). Distribution of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots: their fungicidal activity towards take-all disease. *Phytochemistry*, 25(9), 2075-2893.
- Crombie, W.M.L., Crombie, L., Green, J.B., & Lucas, J.A. (1986). Pathogenicity of 'take-all' fungus to oats: Its relationship to the concentration and detoxification of the four avenacins. *Phytochemistry*, 25(9), 2075-2083.
- Csonka, L.N., Gelvin, S.B., Goodner, B.W., Orser, C.S., Siemieniak, D., & Slightom, J.L. (1988). Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene of Escherichia coli that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene*, 64(2), 199-205.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites), in Biochemistry and molecular biology of plants (eds B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones).
- CVRVV, (2017). Região Demarcada- Vinhos Verdes. Acedido em 3 de setembro de 2017 em: <http://www.vinhoverde.pt:8081/pt/vinhoverde/regiao/default.asp> .

- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., & Caudwell, A. (1992). Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, 121(1), 95-103.
- Daniel, C., Pfammatter, W., Kehrl, P., & Wyss, E. (2005). Processed kaolin as an alternative insecticide against the European pear sucker, *Cacopsylla pyri* (L.). *Journal of Applied Entomology*, 129(7), 363–367.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, & O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- DGAV (2013). Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada da Videira. Acedido em 20 de julho de 2017: <http://www.drapc.min-agricultura.pt>.
- Duduk, B., & Mori, N. (2012). Role of propagation material in phytoplasma dissemination. In: Torres, E., Laviña, A., Jarausch, W., & Bertaccini, A. (eds.), *New Perspectives in Phytoplasma Disease Management*, COST action FA0807 Workshop 2013. Barcelona, ES. pp 48-52.
- Ecker, J.R., & Davis, R.W. (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5202-5206.
- El-Kereamy, A., Chervin, C., Roustan, J.-P., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Raynal, J., Ford, C., Latché, A., Pech, J.-C. & Bouzayen, M. (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*, 119(2), 175–182.
- Eriksson, A., Anfora, G., Lucchi, A., Lanzo, F., Virant-Doberlet, M. & Mazzoni, V. (2012) Exploitation of Insect Vibrational Signals Reveals a New Method of Pest Management. *PLoS ONE*, 7(3), e32954.
- Eriksson, A., Anfora, G., Lucchi, A., Virant-Doberlet, M., & Mazzoni, V. (2011). Inter-Plant Vibrational Communication in a Leafhopper Insect. *PLoS ONE*, 6(5), e19692.
- Esna-Ashari, M., & Mahmoodi Pour, A. (2011). Effect of methyl jasmonate on resveratrol production in organs and cell suspension cultures of two Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(6), 557-562.
- Eveillard, S., Jollard, C., Labroussaa, F., Khalil, D., Perrin, M., Desqué, D., Salar, P., Razan, F., Hévin, C., Bordenave, L., Foissac, X., Masson, J.E. & Malembic-Maher S. (2016). Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild *Vitis* Species. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1762.

- Fan, X., Mattheis, J.P., & Roberts, R.G. (2000). Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiologia Plantarum*, 110(4), 450-454.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., & Scheffer, J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.
- Franceschi, V.R., Krekling, T., & Christiansen, E. (2002). Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *American Journal of Botany*, 89(4), 578-586.
- Franco, A.R., Santos, C., Roriz, M., Rodrigues, R., Lima, M.R.M., & Vasconcelos, M.W. (2011). Study of symptoms and gene expression in four *Pinus* species after pinewood nematode infection. *Plant Genetic Resources* 9(2), 272–275.
- Frausin, C. (2000). Flavescenza dorata e legno nero della vite in Friuli- Venezia Giulia. *Inf. Agrar*, 56, 65–72.
- Fukushima, R.S., & Hatfield, R.D. (2001). Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *Journal of Agriculture and Chemistry*, 49, 3133-3139.
- Galletto, L. & Marzachi, C. (2010). Real- time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: Weintraub, P.G., & Jones, P. (eds.), *Phytoplasmas-Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Oxfordshire, UK: CAB International, 2010. pp 16-33.
- Galetto, L., Miliordos, D.E., Pegoraro, M., Sacco, D., Veratti, F., Marzachi, C., & Bosco, D. (2016). Acquisition of Flavescence Dorée Phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from Different Grapevine Varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1563.
- Gambino, G., Boccacci, P., Margaria, P., Palmano, S. & Gribaudo, I. (2013). Hydrogen Peroxide Accumulation and Transcriptional Changes in Grapevines Recovered from Flavescence Dorée Disease. *Phytopathology*, 103(8), 776-784.
- Golawska, S. (2007). Deterrence and Toxicity of Plant Saponins for the Pea Aphid *Acyrtosiphon Pisum* Harris. *Journal of Chemical Ecology*, 33(8), 1598-1606.
- Granett, J., Walker, M.A., Kocsis, L., & Omer, A.D. (2001). Biology and management of grape phylloxera. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 387-412.
- Haralampidis, K., Trojanowska, M., & Osbourn, A.E. (2002). Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 75, 31-49.
- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannières, M., Shelp, B.J., Moréra, S., & Faure, D. (2009). Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-



- sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 1487-14592.
- Himeno, M., Kitazawa, Y., Yoshida, T., Maejima, K., Yamaji, Y., Oshima, K., & Namba, S. (2014). Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports*, 4, 4111.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D.P.S. (2000). Removal of Feedback Inhibition of  $\Delta$ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1129–1136.
- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., Gruden, K. (2009). 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10, 460-460.
- Huang, J.J., Lin, S., Xu, W., & Cheung, P.C.K. (2017). Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances*, 35(5), 597-618.
- Infovini (2017). Loureiro. Acedido em 19 de julho de 2017 em: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=45&codCasta=3>.
- IRPCM, 2004. “*Candidatus* Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1243-1255.
- Jarausch, W., Angelini, E., Eveillard, S., & Malembic-Maher, S. (2013). Management of fruit tree and grapevine phytoplasma diseases through genetic resistance. In: *New Perspectives in the Management- Cost Action FAO 807*, Barcelone, ESP. pp 56-63.
- Kogovšek, P., Hodgetts, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., Lenarčič, R., Rotter, A., Dickinson, M., Boonham, N., Dermastia, M. & Ravnikar, M. (2015). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 64(2), 286–296.
- Kumari, M., Pandey, S., Bhattacharya, A., Mishra, A., & Nautiyal, C.S. (2017). Protective role of biosynthesized silver nanoparticles against early blight disease in *Solanum lycopersicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 216-225.
- Landi, L., & Romanazzi, G. (2011). Seasonal variation of defense-related gene expression in leaves from bois noir affected and recovered grapevines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6628-6637.
- Le Provost, Herrera, R., Paiva, J.A.P., Chaumeil, P., Salin, F., & Plomion, C. (2007). A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research*, 40(3), 291-297.

- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E, Bottner, K.D, Marcone, C., & Seemüller, E. (2004a). 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1037–1048.
- Lee, I.-M., Martini, M., Marcone, C., & Zhu, S.F. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 337–347.
- Lee, I.-M., Bottner, K. D., Secor, G., & Rivera-Varas, V. (2006a). 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1593-1597.
- Lee, I.-M., Zhao, Y., & Bottner, K.D. (2006b). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 87-91.
- Lefol, C., Caudwell, A., Lherminier, J., & Larrue, J. (1993). Attachment of the flavescence dorée pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of Applied Biology*, 123(3), 611-622.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padiou, E., Larrue, J., Louis, C., & Caudwell, A. (1994). Propagation of flavescence dorée MLO (Mycoplasma-like Organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(3), 285-293.
- Lessio, F., & Alma, A. (2004). Dispersal patterns and chromatic response of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine flavescence dorée. *Agricultural and Forest Entomology*, 6(2), 121–128.
- Lessio, F., Tedeschi, R., & Alma, A. (2007). Presence of *Scaphoideus titanus* on American grapevine in woodlands, and infection with "flavescence dorée" phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 373-374.
- Li, H.S. (2000). Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment. Higher Education Press, Beijing, (in Chinese).
- Machado, A.C.M. (2014). A problemática da Flavescência dourada da videira e o seu vetor na Região dos Vinhos Verdes (concelho de Santo Tirso). Tese de Mestrado em Engenharia Agronómica. Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 150pp.
- Machado, J.P.M.V. (2011). Desfolha Precoce à Floração na Casta Loureiro (*Vitis vinifera* L.): Efeitos nas Componentes de Rendimento e Características Físico-Químicas

- dos Mosto. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 89pp.
- Mannini F. (2007). Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infection. *Bulletin of Insectology* 60(2), 311-312.
- Margaria, P., Turina, M., & Palmano, S. (2009). Detection of “flavescence dorée” and “bois noir” phytoplasmas, grapevine leafroll associated virus-1 and -3 and grapevine virus A from the same crude extract by reverse transcription-RealTime Taqman assays. *Plant Pathology*, 58(5), 838–845.
- Margaria, P., & Palmano, S. (2011). Response of the *Vitis vinifera* L. cv. ‘Nebbiolo’ proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics*, 11(2), 212-224.
- Margaria, P., Abbà, S., & Palmano, S. (2013). Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. *BMC Genomics*, 14(1), 38.
- Margaria, P., Ferrandino, A., Caciagli, P., Kedrina, O., Schubert, A., & Palmano, S. (2014). Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, Cell & Environment*, 37(9), 2183-2200.
- Markó, V., Blommers, L.H.M, Bogya, S., & Helsen, H. (2007). Koalin particle films suppress many apple pests, disrupt natural enemies and promote woolly apple aphid. *Journal of Applied Entomology*, 132(1), 26-65.
- Martinez-Esteso, M.J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A, & Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73(2), 331-341.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P. A., Benedetti, R., & Bertaccini, A. (2002). Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 197-208.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J., & Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 2037-2051.

- Mary, W., Crombie, L., & Crombie, L. (1986). Distribution of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots: Their fungicidal activity towards 'take-all' fungus. *Phytochemistry*, 25(9), 2069-2073.
- Marzorati, M., Alma, A., Sacchi, L., Pajoro, M., Palermo, S., Brusetti, L., Raddadi, N., Balloi, A., Tedeschi, R., Clementi, E., Corona, S., Quaglino, F., Bianco, P.A., Beninati, T., Bandi, C. & Daffonchio, D. (2006). A Novel Bacteroidetes Symbiont Is Localized in *Scaphoideus titanus*, the Insect Vector of Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1467–1475.
- Mazzoni, V., Lucchi, A., Čokl, A., Prešern, J., & Virant-Doberlet, M. (2009). Disruption of the reproductive behaviour of *Scaphoideus titanus* by playback of vibrational signals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 133(2), 174–185.
- Mert-Türk, F. (2006). Saponins versus plant fungal pathogens. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5(1), 13-17.
- Mo, Y.-Y., Geibel, M., Bonsall, R.F., & Gross, D.C. (1995). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) Leaves for plant signal molecules that activate the sryB gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 107, 603-612.
- Montano, H.G., Davis, R.E., Dally, E.L., Hogenhout, S.A., Pimentel, J.P., & Brioso, P.T.S. (2001). 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1109–1118.
- Mori, N., Bressan, A., Martini, M., Guadagnini, M., Girolami, V., & Bertaccini, A. (2002). Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée-type phytoplasmas. *Vitis* 41(2), 99-102.
- Moore, J.P., Westall, K.L., Ravenscroft, N., Farrant, J.M., Lindsey, G.G., & Brandt, W.F. (2005). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochemical Journal*, 385(1), 301–308.
- Morone, C., Boveri, M., Giosuè, S., Gotta, P., Scapin, I., & Marzachi, C. (2007). Epidemiology in northwestern Italy. *Phytopathology*, 97(11), 1422-1427.
- Morrissey, J.P., & Osbourn, A.E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708–724.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.O.F, Dornelas, M.C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), 360-376.

- Musetti, R., di Toppi, L.S., Ermacora, P., & Favali, M.A. (2004). Recovery in Apple Trees Infected with the Apple Proliferation Phytoplasma: An Ultrastructural and Biochemical Study. *Phytopathology*, 94(2), 203-208.
- Nunes da Silva, M., Lima, M.R.M., & Vasconcelos, M.W. (2013). Susceptibility evaluation of *Picea abies* and *Cupressus lusitanica* to the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Plant Pathology*, 62(6), 1398-1406.
- Oliveira, J.M.M. (2000). Aromas Varietais e de Fermentação Determinantes da Tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho. Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica. Escola de Engenharia- Universidade do Minho, Minho. 267pp.
- Oliveira, M.J., Roriz, M., Bertaccini, A., Vasconcelos, M.W., & Carvalho, S.M.P (2017). Classic and Novel approaches for controlling “flavescence dorée” in grapevine: knowledge gaps and future prospects.
- Osbourn, A. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8(10), 1821–1831.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S.-i., Ugaki, M., & Namba, S. (2003). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36(1), 27-29.
- Papura, D., Delmotte, F., Giresse, X., Salar, P., Danet, J.L., Van Helden, M., Foissac, X., & Malembic-Maher, S. (2009). Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence dorée phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 867-876.
- Paré, P.W., Alborn, H.T., & Tumlinson, J.H. (1998). Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13971-13975.
- Patel, S.B., Santini, D., Shah, M.B., & Patel, V.S. (2012). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of *Bryonia Laciniosa* seed extract and its saponin fraction in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Young Pharmacists*, 4(3), 171-176.
- Pavan, F., Mori, N., Bressan, S., & Mutton, P. (2012). Control strategies for grapevine phytoplasma diseases: factors influencing the profitability of replacing symptomatic plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 11-22.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X., & Malembic-Maher, S. (2009). Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48(2), 87-95.

- Pinto, V.D.A. (2016). Influência da Flavescência Dourada no desenvolvimento da videira cv. "Loureiro" e potencial da aplicação do elicitador metil jasmonato no controlo da doença. Relatório de Estágio em Engenharia Agronómica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 41pp.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M., & Dermastia, M. (2013). Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62(4), 760-766.
- Punelli, F., Fileccia, V., Al Hassan, M., Uva, P., Pasquini, G., & Martinelli, F. (2016). A microarray analysis highlights the role of tetrapyrrole pathways in grapevine responses to "stolbur" phytoplasma, phloem virus infections and recovered status. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 129-137.
- Purcell, A. H. (1982). Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 397-417.
- Rigamonti, I.E., Jermini, M., Fuog, D., & Baumgärtner, J. (2011). Towards an improved understanding of the dynamics of vineyard-infesting *Scaphoideus titanus* leafhopper populations for better timing of management activities. *Pest Management Science*, 67(10), 1222-1229.
- Rudell, D., Mattheis, J. P., Fan, X., & Fellman, J. (2002). Methyl Jasmonate Enhances Anthocyanin Accumulation and Modifies Production of Phenolics and Pigments in "Fuji" Apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (3) 435-441.
- Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). Improving grape phenolic content and wine chromatic characteristics through the use of two different elicitors: methyl jasmonate versus benzothiadiazole. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1283-1290.
- Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2013). Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture*, 3(1), 33–52.
- Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikulič-Petkovšek, M., & Veberič, R. (2012). Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 231-237.
- Sá, C., Andrade, A., & Guerner J. (2010). Prospecção do fitoplasma da Flavescência Dourada e do insecto vector *Scaphoideus titanus* Ball. e medidas de erradicação. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

- Santi, S., De Marco, F., Polizzotto, R., Grisan, S., & Musetti, R. (2013). Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 4, 171.
- Saradhi, P.P., AliaArora, S., & Prasad, K.V.S.K. (1995). Proline accumulates in plants exposed to uv radiation and protects them against uv-induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(1), 1-5.
- Schat, H., Sharma, S.S., & Vooijs, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 477–482.
- Schmelz, E.A., Alborn, H.T., & Tumlinson, J.H. (2003). Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 117(3), 403-412.
- Schneider, B., Gibb, K. S., & Seeümller, E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143(10), 3381-3389.
- Sims, D.A., & Gamon, J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote sensing of Environment*, 81, 337-354.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H, Seemüller, E., & Kirkpatrick, B.C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16s-23s rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2988-2933.
- Sogrape, Vinhos Portugal (2017). Vinhos Verdes. Acedido em 3 de setembro de 2017 em: <https://www.sograpevinhos.com/regioes/Vinhos%20Verdes/Planta> .
- Sugio, A., & Hogenhout, S. A. (2012). The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 247-254.
- Szabados, L., & Saviouré, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N., & Okazaki, M. (2001). Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry*, 268(14), 4086-4094.
- Tan, J.J., Ye, J.R., Wu, X.Q., Zhu, Y.F., & Li, Y. (2005). A study on disease development and early diagnosis of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, infection of Japanese black pine. *Nematology*, 7, 481-485.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., & Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of

- Ligustrum vulgare under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163(3), 547-561.
- Thakur, M., & Sohal, B.S. (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 762412.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147-157.
- Tubajika, K.M., Civerolo, E.L., Puterka, G.J., Hashim, J.M., & Luvisi, D.A. (2007). The effects of kaolin, harpin, and imidacloprid on development of Pierce's disease in grape. *Crop Protection*, 26(2), 92-99.
- Vitali, M., Chitarra, W., Galleto, L., Bosco, D., Marzachi, C., Gullino, M.L., Spanna F., & Lovisolò, C. (2013). Flavescence dorée phytoplasma deregulates stomatal control of photosynthesis in *Vitis vinifera*. *Annals of Applied Biology*, 162(3), 335-346.
- Wang, K., Jin, P., Shang, H., & Zheng, Y. (2010). Effect of Methyl Jasmonate in Combination with Ethanol Treatment on Postharvest Decay and Antioxidant Capacity in Chinese Bayberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9597-9604.
- Weintraub, P.G., & Wilson, M.R. (2010). Control of Phytoplasma Diseases and Vectors. In: Weintraub P.G, Jones P, eds. *Phytoplasmas-Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Oxfordshire, UK: CAB International; 2010, pp 272-92.
- Widodo, Patterson, J. H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., & Roessner, U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 4089–4103.
- Yan, X., Qiao, H., Zhang, X., Guo, C., Wang, M., Wang, Y., & Wang, X. (2017). Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TPL29 contributes to disease resistance. *Scientific Reports*, 7, 4269.
- Yang, S.-L., Lan, S.-S., & Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 166(15), 1694-1699.
- Yoon, J.Y., Hamayun, M., Lee, S.-K., & Lee, I.-J. (2009). Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(2), 63-68.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., & Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of



- proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 7(5), 751–760.
- Zahavi, T., Peles, S., Harari, A.R., Soroker, V., & Sharon, R. (2007). Push and pull strategy to reduce *Hyalesthes obsoletus* population in vineyards by *Vitex agnus castus* as trap plant. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 297-298.
- Zhao, J., Davis, L.C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
- Zhong, B.-X, & Shen, Y.-W. (2004). Accumulation of Pathogenesis- related Type-5 Like Proteins in Phytoplasma infected Garland Chrysanthemum *Chrysanthemum coronarium*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(11), 773-779.

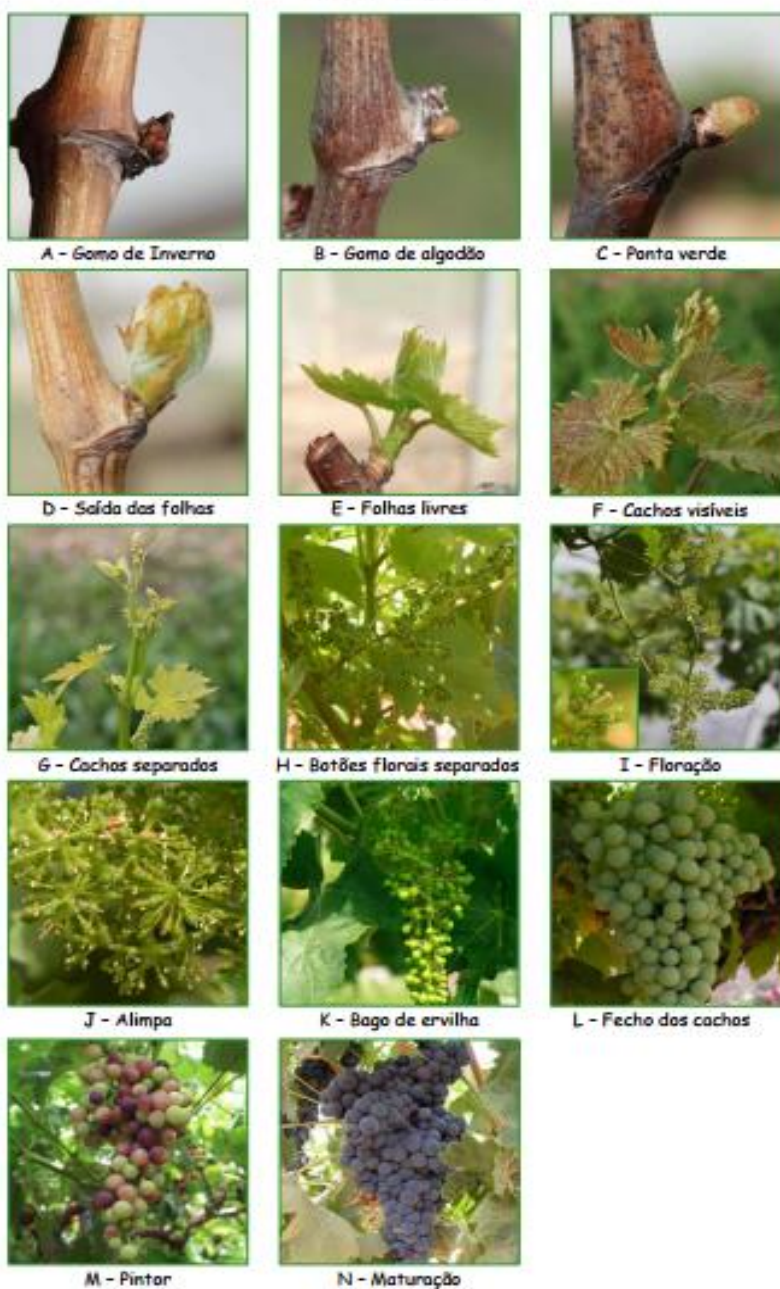
## 7. Anexos

Anexo I- Escala dos Estados Fenológicos da Videira, segundo Baggiolini.

Retirado de Direção de Serviços de Agricultura e Pescas/ Divisão de Sanidade Vegetal



### ESTADOS FENOLÓGICOS DA VINHA (Segundo Baggiolini)



Fotos: Eugénia Neto

Outubro  
2011