

**Caracterização fenológica e molecular de isolados associados à botriosferiose,  
agressividade de isolados, suscetibilidade de castas nacionais e eficácia de  
produtos fungicidas relativamente a *Lasiodiplodia* spp.**

**Ana Patrícia Lopes Gaspar**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Agronómica**

Orientadores: Engenheira Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Mestre Pedro Miguel Reis

**Júri:**

Presidente: Doutor, Henrique Manuel Filipe Ribeiro, Professor Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogal: Doutora, Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogal: Licenciada, Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Engenheira Cecília Rego pelo apoio, disponibilidade e aprendizagem que me proporcionou ao longo deste trabalho.

Ao Engenheiro Pedro Reis por ter aceitado ser meu orientador e um agradecimento muito especial por todo o apoio e disponibilidade ao longo da realização do trabalho e pela amizade que me fez continuar mesmo nos momentos difíceis.

Os meus agradecimentos ao Professor Artur Alves da Universidade de Aveiro por me ter recebido e por todo o apoio que deu durante o tempo que lá estive.

À Andreia Cabanas, pela amizade e paciência que teve para me ouvir e aturar. Um especial obrigado por ter sempre uma palavra amiga e encorajadora nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que me acompanharam nesta jornada de 2 anos, obrigada pela amizade e por sempre acreditarem que era possível acabar. Um especial obrigado à Susana Ramos, que durante estes 2 anos esteve sempre ao meu lado e que, durante a tese me aturou e que me guiou até ao fim com a sua força.

Por último, mas não menos importante, à minha família que sempre esteve presente e me apoiou do início ao fim.

## Resumo

As Doenças do Lenho da Videira (DLV) têm tido uma crescente importância a nível mundial nas últimas décadas. A botriosferiose ou botryosphaeria dieback é uma das doenças que causa mais estragos e prejuízos, havendo uma espécie, *Lasiodiplodia* spp., que em particular, emergiu como um patógeno agressivo provocando estragos severos na vinha principalmente em regiões de clima tropical. Recentemente, e possivelmente devido a alterações climáticas, esta espécie começou a ser identificada em vinhas de países com clima temperado, sendo Portugal um exemplo destes países.

Assim sendo, ao longo desta tese foi realizada a caracterizações fenológica e molecular de um conjunto de 30 isolados, que permitiu a identificação de *Diplodia seriata* (17 isolados), *Diplodia mutila* (um isolado), *Neofusicoccum parvum* (cinco isolados) e *Lasiodiplodia* spp. (sete isolados). Paralelamente, devido à escassez de conhecimento acerca da patogenicidade de *Lasiodiplodia* spp. e da suscetibilidade de castas portuguesas foram instalados ensaios em estufa que decorram ao longo de quatro meses. A agressividade dos isolados obtidos em Portugal foi claramente superior à agressividade dos isolados provenientes do Peru, causando maiores lesões tanto a nível interno como externo. A percentagem de reisolamento foi igualmente superior para isolados obtidos em Portugal. Relativamente à suscetibilidade varietal, a casta que parece ser a mais suscetível a todos os isolados foi a Touriga Nacional.

Foi também instalado na vinha do Almotivo do ISA, um ensaio de eficácia de fungicidas para isolados de *Lasiodiplodia* spp. Como inóculo artificial foi utilizado um isolado de Portugal, um isolado do Peru e um isolado referência (CBS). A eficácia foi superior quando os produtos foram utilizados em combinação com o CA3365 quer para o Tessior® quer para o Esquive®. Assim, é possível concluir que são potenciais tratamentos de controlo preventivo deste patógeno.

**Palavras-chave:** *Vitis vinifera*, doença do lenho, patogenicidade, meios de luta, *Botryosphaeriaceae*

## **Abstract**

Grapevine Trunk Diseases (GTD) have become increasingly important worldwide, including botryosphaeria dieback, among which one particular species is emerging as an aggressive pathogen causing severe damages to the vines, especially in tropical regions. Recently, possibly due to climate change, these species have started to be isolated in temperate countries being Portugal an example of these countries.

Therefore, along this thesis a phenological and molecular characterization of a collection of 30 isolates was carried out, allowing the identification of the species *Diplodia seriata* (17 isolates), *Diplodia mutila* (one isolate), *Neofusicoccum parvum* (five isolates) and *Lasiodiplodia* spp. (seven isolates). Due to the lack of knowledge about the pathogenicity of *Lasiodiplodia* spp. in Portuguese grape varieties, susceptibility assays were set up. The pathogenicity of the national isolates was clearly superior to the pathogenicity of the isolates obtained in Peru and which caused larger internal and external lesions, and also showed higher percentages of reisolation. Regarding cultivar susceptibility, our results suggest that the most susceptible cultivar amongst the ones studied, was Touriga Nacional.

A field experiment was conducted at Almotivo vineyard (ISA), to evaluate the fungicide efficacy of two products (Tessior® and Esquive®) applied alone or in mixture with a third (CA3365). As artificial inoculum, an isolate from Portugal, one from Peru and one from CBS (reference isolate) (CBS), were used. It was evident that their effect was superior when they were used in mixture. Thus, it is possible to raise the hypothesis that they could have potential to preventively control this pathogen.

**Key Words:** pathogenicity, disease control, grapevine trunk diseases, *Vitis vinifera*, *Botryosphaeriaceae*

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	ii
<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Índice</b> .....	v
<b>Índice de Quadros</b> .....	vii
<b>Índice de Figuras</b> .....	viii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Botriosferiose</b> .....	3
2.1. Agentes causais .....	3
2.2. Ciclo da doença .....	4
2.3. Sintomas .....	6
2.4. Meios de Luta .....	6
2.4.1. Culturais.....	7
2.4.2. Químicos.....	8
2.4.3. Biológicos.....	10
<b>3. Objetivos</b> .....	11
<b>4. Material e Métodos</b> .....	12
<b>4.1. Caracterização de isolados de Botryosphaeriaceae</b> .....	12
4.1.1. Isolados.....	12
4.1.2. Caracterização cultural e morfológica.....	14
4.1.3. Caracterização molecular .....	15
<b>4.2. Determinação da agressividade de isolados do género <i>Lasiodiplodia</i></b> .....	17
4.2.1. Material vegetal .....	17
4.2.2. Inoculação em plantas envasadas .....	18
4.2.3. Observação e tratamento de dados.....	18
<b>4.3. Ensaio de fungicidas</b> .....	18
4.3.1. Instalação do ensaio.....	18
4.3.2. Descrição do ensaio.....	21
4.3.3. Observação e análise de dados .....	22
<b>5. Resultados</b> .....	23
5.1. Caracterização Morfológica.....	23
5.2. Caracterização Cultural .....	25
5.3. Caracterização Molecular.....	28

5.4.	Determinação da agressividade de isolados do género <i>Lasiodiplodia</i> .....	29
5.5.	Ensaio de Fungicidas .....	36
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>45</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>46</b>
<b>Anexos</b>	.....	<b>53</b>

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.</b> Identificação dos isolados de <i>Botryosphaeria</i> spp. (Bt.) em estudo: código, referência do isolado, cultivar, local de colheita e região de isolamento. ....	13
<b>Quadro 2.</b> Identificação dos isolados de referência de <i>Botryosphaeria</i> spp. ....	14
<b>Quadro 3.</b> Composição da mistura de reação do PCR utilizada na tipagem.....	15
<b>Quadro 4.</b> Composição da mistura de reação do PCR utilizada para amplificação da região do ITS (Internal Transcribed Spacer) .....	16
<b>Quadro 5.</b> Composição da mistura de reação do PCR utilizada para amplificação de parte da região do EF 1 $\alpha$ (Elongation Factor). ....	17
<b>Quadro 6.</b> Tratamentos, Produtos, Inóculo e cores utilizadas no ensaio de campo. ....	19
<b>Quadro 7.</b> Cultivares, Produtos utilizados e linhas da vinha respectivas. ....	20
<b>Quadro 8.</b> Produtos, época de aplicação, concentração de substância ativa e data de aplicação. ....	21
<b>Quadro 9.</b> Características morfológicas dos conídios de 30 isolados de <i>Botryosphaeriaceae</i> , em meio de agarose a 1,5% contendo agulhas de pinheiro à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e com um ciclo de 12h na obscuridade e 12h de luz branca.....	23
<b>Quadro 10.</b> Características culturais de 30 isolados de <i>Botryosphaeriaceae</i> (Bt.) em PDA ao fim de 8 dias em condições de obscuridade e à temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ .....	26
<b>Quadro 11.</b> Lista dos isolados em estudo e respetiva espécie identificada .....	29

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo da botriosferiose (Adaptado de Gramaje & Larignon, 2015) .....	5
<b>Figura 2.</b> Sintomas associados a botriosferiose observados em campo. A) Abrolhamento irregular ou inexistente; B) Murchidão dos cachos; C) Necroses nos sarmentos; D) Cancros alongados no lenho das varas. ....	6
<b>Figura 3.</b> Foto aérea da vinha do Almotivo no ISA com as linhas de cada casta delineadas a vermelho: A) Touriga Nacional e B) Cabernet Sauvignon.....	20
<b>Figura 4.</b> Conídios dos isolados de Botryosphaeriaceae em estudo: A) conídios de <i>Diplodia seriata</i> , B) conídios de <i>Lasiodiplodia</i> sp., C) conídios de <i>Neofusicoccum parvum</i> , D) conídios de <i>Diplodia mutila</i> (Barra de escala = 10 µm).....	25
<b>Figura 5.</b> Culturas de Botryosphaeriaceae (Bt.) em meio de PDA ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25±1°C: <b>Grupo I:</b> Bt.206, Bt.212, Bt.223, Bt.102, Bt.105, Bt.106, V3, V15; <b>Grupo II:</b> Bt.216, Bt.103, CBS 124060; <b>Grupo III:</b> Bt.217; <b>Grupo IV:</b> Bt.201, Bt.203, Bt.204, Bt.207, Bt.209, Bt.215, Bt.218, Bt.221; <b>Grupo V:</b> Bt.202, Bt.205, Bt.211, Bt.213; <b>Grupo VI:</b> Bt.208, Bt.214....	27
<b>Figura 6.</b> Dendrograma obtido na tipagem do DNA dos isolados Botryosphaeriaceae em estudo (o isolado Bt.207 não está presente no dendrograma porque não foi ampliado).....	28
<b>Figura 7.</b> Área das lesões externas (cm <sup>2</sup> ), 5 semanas após inoculação, provocadas pelos isolados CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15 e controlo nas castas Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon e Baga. Para cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).....	31
<b>Figura 8.</b> Comprimento das lesões internas (cm), 4 meses após inoculação, provocadas pelos isolados (CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15 e controlo) nas castas Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon e Baga. Para cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).....	33
<b>Figura 9.</b> Percentagem de reisolamentos de cada isolado (CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15, controlo) obtidas a partir dos sarmentos inoculados das castas, Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon. Em cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).....	35
<b>Figura 10.</b> Percentagens de reisolamentos dos isolados inoculados na vinha do Almotivo (ISA) de acordo com cada combinação tratamento - isolado realizado para a casta Cabernet. Tratamentos 1 - 4: Esquive® (Trichoderma atroviride); Tratamentos 5 – 8: Esquive® (Trichoderma atroviride-I 1237) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 9 – 12: Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero); Tratamentos 13 – 16: Tessior® (boscalide + piraclostrobina+ polímero) + CA3356	

(nanopartículas de cobre); Tratamentos 17 – 19: sem produto aplicado. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis). ..... 39

**Figura 11.** Percentagens de reisolamentos dos isolados inoculados na vinha do Almotivo (ISA) de acordo com cada combinação tratamento - isolado realizado para a casta Touriga Nacional. Tratamentos 1 - 4: Esquive® (Trichoderma atroviride-I 1237); Tratamentos 5 – 8: Esquive® (Trichoderma atroviride) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 9 – 12: Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero); Tratamentos 13 – 16: Tessior® (boscalide + piraclostrobina+ polímero) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 17 – 19: sem produto aplicado. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis). ... 40

## **Abreviaturas**

ACV – Adega Cooperativa da Vermelha

ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

AVA - Associação de Viticultores de Alenquer

AVIPE – Associação de Viticultores do Conselho de Palmela

BCA/ABC – Agente de biocontrolo (Biocontrol Agent)

Bt. - *Botryosphaeria*

CBS - Centralbureau voor Schimmelcultures

DLV – Doenças do Lenho da Videira

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EF – Elongation Factor

ISA – Instituto Superior de Agronomia

ITS - Internal Transcribed Spacer

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDA – Potato Dextrose Agar

RPM – Rotações por minuto

spp. - Espécies

## 1. Introdução

O género *Vitis* é cultivado há mais de 7000 anos (Mullins *et al.*, 1992) e conta com mais de 100 espécies diferentes que são cultivadas pelo mundo. A espécie *Vitis vinifera* é cultivada em climas Mediterrâneos e outros climas temperados, entre as latitudes de 30° e 50° tanto no hemisfério Norte como no hemisfério Sul (Gramaje *et al.*, 2018). Assim sendo, a vinha tem um elevado valor comercial seja para a produção de vinho, uva de mesa, ou para passas (Gramaje *et al.*, 2018).

A videira é suscetível a 29 doenças causadas por fungos (Wilcox *et al.*, 2015), entre as quais estão as Doenças do Lenho da videira (DLV) que são das mais severas (Bertsch *et al.*, 2013). Esta situação conduziu a um enorme gasto no controlo de doenças seja por meios culturais, químicos ou biológicos, sendo que, mais de metade dos gastos anuais na vinha provém da luta contra as doenças da videira (Cooper *et al.*, 2012).

A primeira doença do lenho da videira de que há registo foi reportada no fim do século XIX em França, sendo na altura denominada como esca (Gramaje *et al.*, 2018). Estudos realizados no início do século XX, nos EUA, indicaram que a espécie *Phomopsis viticola* estava associada a cancos e a dieback, a doença atualmente designada por *Phomopsis dieback* (Úrbez-Torres *et al.*, 2013), e que a doença conhecida como *Eutypa dieback* (eutipiose) foi encontrada pela primeira vez na Austrália em damasqueiro e videira (Carter, 1957a, b).

Apesar de as DLV serem conhecidas desde o século XIX, ganharam maior importância recentemente (Gramaje *et al.*, 2018). Segundo Mugnai (2011), o termo DLV foi determinado pelo Doutor Luigi Chiarappa juntamente com outros cientistas nos anos 90, para agregar num único grupo um conjunto de fungos com sintomas similares, que infetam as videiras através das feridas de poda e colonizam o sistema vascular. Deste modo, as DLV constituem um diverso complexo de espécies que, cada vez mais, são difíceis de combater porque estes fungos colonizam os órgãos perenes da videira (Bertsch *et al.*, 2013); têm uma grande variabilidade de expressão sintomática, o diagnóstico é difícil e não existe qualquer tipo de tratamento curativo para as combater (Lambert *et al.*, 2012).

Este aumento de infeção na vinha pode dever-se a diversos fatores. Em primeiro lugar, o facto de se ter verificado um grande aumento de plantação de vinha nos anos 90, fez com que muito material circulasse podendo estar contaminado, disseminando, assim, este complexo de doenças pelo mundo (Gramaje & Armengol, 2011). Em segundo lugar, a intensificação da cultura da vinha tradicional para uma maior densidade de plantas em conjunto com a adoção de novas práticas culturais como a poda e a vindima mecânica, levaram a uma maior existência de feridas de poda, beneficiando a dispersão das DLV (Gramaje *et al.*, 2018). Por outro lado, existiu também um aumento da atividade viveirista de modo a dar resposta ao aumento de procura, o que levou a uma produção intensiva de enxertos prontos e, nestas condições, ocorreram mais contaminações entre plantas. Estas plantas infetadas que

não exibiam sintomas quando chegavam ao viticultor eram plantadas e mais tarde, após serem expostas a diferentes fatores de stress, desenvolviam as doenças (Rubio & Garzón, 2011). Por fim, o facto do arsenito de sódio e os fungicidas como o benzimidazol e o brometo de metilo terem sido banidos no início dos anos 2000 por razões ambientais e de saúde humana, fez com que não houvesse alternativas eficazes contra as DLV, o que as tornou numa maior ameaça (Decoin, 2001). Segundo Gramaje *et al.* (2018), o controlo das DLV é difícil e é influenciado pela(s) doença(s) e pelo(s) patogénio(s) envolvidos. Dado que os métodos de controlo químico mais eficazes foram banidos, a alternativa foi dar preferência à prevenção em vez do combate ou erradicação (Úrbez-Torres, 2011). Nas últimas três décadas verificou-se que as DLV são bastante destrutivas e que se estão a tornar cada vez mais preocupantes em todo o mundo vitícola (Hofstetter *et al.*, 2012). Num relatório recente publicado pela OIV constatou-se que em Espanha, em 2003, existiam 1,8% de vinhas infetadas e que em 2007 já se verificavam 10,5% de plantas infetadas. Em França cerca de 13% das vinhas estavam infetadas com esca, botriosferiose e eutipiose em 2014 (de La Fuente *et al.*, 2012). Na Califórnia, cerca de 14% da produção de vinho é perdida devido a DLV, tais como a esca e a botriosferiose, conduzindo a uma perda de 260 milhões \$US anualmente, sendo que a esca é responsável por uma perda de cerca de 2.000 – 3.000\$ por hectare por ano (de La Fuente *et al.*, 2012). Num estudo desenvolvido na Nova Zelândia, cerca de 88% das vinhas tinham algum nível de infeção de DLV (Fontaine *et al.*, 2016). Em Portugal, as doenças que mais afetam videiras adultas são a botriosferiose (*botryosphaeria dieback*) e a esca provocando muitos estragos e levando a prejuízos avultados (Rego *et al.*, 2005).

As cinco DLV mais importantes a nível mundial são a eutipiose (*eutypa dieback*), esca e botriosferiose (*botryosphaeria dieback*) nas vinhas adultas e a doença de Petri e o pé negro nas vinhas jovens (Larignon *et al.*, 2009). Estas doenças causadas por complexos de fungos começaram a ser descritas no fim do século XX (Bertsch *et al.*, 2009) e, a sua importância mundial crescente deve-se à similaridade de sintomas que as torna difíceis de distinguir entre si. Além disso, por vezes, existe mais do que uma espécie de fungos envolvida. Estas doenças são preocupantes não só causarem estragos em plantas adultas, mas também por contaminarem plantas jovens levando a uma diminuição da produtividade e da longevidade da vinha e consequentemente a uma perda económica acentuada para os viticultores (Gramaje *et al.*, 2011), sendo por isso, uma ameaça séria no mundo da viticultura (Mondello *et al.*, 2018).

Por exemplo, a doença de Petri, que ataca as vinhas jovens, pode ser identificada através da presença de compostos fenólicos no xilema que lhe conferem uma cor escura, estrias escuras, quando a planta é seccionada transversalmente (Rooney-Latham *et al.*, 2005). A doença do pé negro, também importante nas vinhas jovens, pode ser identificada através de lesões necróticas nas raízes e necroses castanho avermelhadas na base do tronco da videira. O sarmento que se desenvolve a partir desta base infetada, surge necrosado e posteriormente ocorre a morte das jovens videiras (Halleen *et al.*,

2006). Quanto, à eutipiose, mais importante em vinhas adultas, é detetada através da presença de folhas cloróticas de dimensões reduzidas e sarmentos atrofiados (Mahoney *et al.*, 2005). Os cachos ficam pequenos e pode ocorrer desavinho ou bagoinha; os bagos amadurecem desigualmente e mais tarde os cachos podem até mumificar e morrer (Gramaje *et al.*, 2018). Estes sintomas podem aparecer 3 a 8 anos após infeção e podem ser erráticos (Sosnowski *et al.*, 2007), sendo que uma planta que demonstre sintomas num ano, pode não mostrar qualquer tipo de sintomas durante a campanha do ano seguinte.

Outra das doenças pertencentes ao complexo DLV é a botriosferiose. É considerada uma das doenças do lenho mais disseminadas e importantes em Portugal, e está associada a um complexo de fungos da família *Botryosphaeriaceae*. Atualmente, estão identificadas 26 espécies diferentes dentre os géneros pertencentes a esta família incluindo espécies dos géneros *Diplodia*, *Neofusicocum* e *Lasiodiplodia* (Gramaje *et al.*, 2018). As espécies do género *Lasiodiplodia*, em particular *L. theobromae* emergiram como um patogénio agressivo que provoca estragos severos na vinha principalmente em regiões de clima tropical (Alves *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Linaldeddu *et al.*, 2015). Recentemente, possivelmente devido a alterações climáticas, esta espécie começou a ser isolada em vinhas de países de clima temperado, sendo Portugal um exemplo destes países (Rego *et al.*, 2005).

## **2. Botriosferiose**

### **2.1. Agentes causais**

A família *Botryosphaeriaceae* é bastante complexa, tendo sido alvo de diversas alterações taxonómicas ao longo dos tempos e está em constante rearranjo taxonómico, o que torna os trabalhos de investigação mais demorados e penosos. Além disso, os fungos desta família apresentam importância económica crescente a nível mundial (Cardoso *et al.*, 2018), estando associados a diversas doenças e sintomas da videira o que, os torna de difícil diagnóstico e distinção (van Niekerk *et al.*, 2006). Estes colonizam um vasto leque de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas e gimnospérmicas, e podem causar sintomas em ramos lenhosos, folhas, inflorescências e frutos (Crous *et al.*, 2006).

A família *Botryosphaeriaceae* é composta por 17 géneros e um total de 110 espécies já foram caracterizadas, de entre os quais fazem parte os géneros *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Neofusicocum* (Phillips *et al.*, 2013). As espécies desta família foram inicialmente identificadas com base nas estruturas assexuadas de cada fungo através da forma e dimensão dos picnídios, mas sobretudo pelo tipo de conídios, visto que são mais fáceis de obter em contexto laboratorial do que as estruturas sexuadas que, raramente são observadas seja na natureza ou em laboratório (Slippers *et al.*, 2017).

O género *Diplodia* tem maioritariamente conídios pigmentados, de formato ovoide e de parede espessa, enquanto, o género *Fusicocum* tem maioritariamente conídios fusiformes, hialinos e de

parede fina (Cardoso *et al.*, 2018). Os outros géneros existentes são de alguma forma, variantes ou intermédios destes dois grandes géneros (Vaz, 2007). No entanto, atualmente considera-se que a descrição das características morfológicas das estruturas assexuadas é insuficiente para identificação das diferentes espécies sendo necessário recorrer a técnicas moleculares de sequenciação de DNA para distinção dos diferentes grupos taxonómicos (Cardoso *et al.*, 2018).

Espécies de *Botryosphaeriaceae* estão presentes em todas as áreas agrícolas e podem revelar um comportamento endofítico nas plantas na forma de patogénio latente o que inclui hábitos saprófitos ou necrotróficos (Cardoso *et al.*, 2018).

Um dos principais locais de infeção dos patogénios associados à botriosferiose são as feridas de poda. A suscetibilidade destas feridas a estes patogénios varia consoante a época de poda e o clima em que a vinha está inserida e pode durar até 12 semanas (Serra *et al.*, 2008; Úrbez-Torres, 2011; van Niekerk *et al.*, 2011). Na Califórnia, a época de maior dispersão de esporos ocorre após períodos de precipitação, no inverno (Úrbez-Torres *et al.*, 2010). Na Nova Zelândia, foram detetados mais esporos no verão, mas verificou-se que ocorria dispersão o ano inteiro (Amponsah *et al.*, 2009), em França este período ocorre de meados da primavera a meados do outono (Kuntzmann *et al.*, 2009) e, do fim do outono até ao início da primavera na África do Sul (van Niekerk *et al.*, 2010) e no Chile (Valencia *et al.*, 2015).

Segundo Úrbez-Torres (2011) as espécies causadoras de botriosferiose estão disseminadas mundialmente. Porém, a espécie *L. theobromae* não se comporta do mesmo modo. Esta espécie existe sobretudo em climas quentes tropicais e subtropicais (Punithalingam, 1976) e na Europa apenas foi encontrada nas regiões quentes de Espanha (Aroca *et al.*, 2008) e na Sicília (Burruano *et al.*, 2008). Atualmente, e por influência das alterações climáticas, esta espécie está a ser identificada noutros países da Europa, sendo Portugal um deles.

A espécie *L. theobromae* está ainda pouco estudada em videira. No entanto, sabe-se que as infeções em plantas jovens ocorrem sobretudo em vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos. Nas plantas adultas, as infeções ocorrem através de feridas de poda e outras feridas. Apesar das infeções, quando provenientes das vinhas-mãe, se poderem manter mais ou menos latentes, podem manifestar-se posteriormente nas jovens plantas se estas forem submetidas a condições favoráveis à sua proliferação (Rego *et al.*, 2012).

## 2.2. Ciclo da doença

Estes patogénios é principalmente propagado por conídios que são dispersos através da chuva e cuja área de dispersão depende da velocidade do vento (Baskarathevan *et al.*, 2013), podendo também dar-se a sua propagação através de material de propagação vegetativa infetado. A infeção ocorre,

sobretudo, através de conídios que são libertados dos picnídios e, transportados pelo vento e pela chuva, vão infetar as plantas vizinhas (Gramaje *et al.*, 2018).

Os picnídios libertam os seus esporos sob condições de precipitação ou elevada humidade relativa e temperaturas acima de 0°C, fatores que também favorecem a germinação dos esporos. Os esporos podem germinar com temperaturas entre 15 - 37°C, mas a temperatura ótima de germinação é entre 23 - 26°C (Úrbez-Torres *et al.*, 2010).

Fatores de stress como a geada, temperaturas muito elevadas no verão, fertilização inadequada, podas mal efetuadas ou não executadas de todo, entre outros favorecem o crescimento do fungo (Rego *et al.*, 2012).

O ciclo biológico da doença botriosferiose é apresentado na Figura 1. Havendo disseminação prévia pela água ou pelo vento, assim que é feita a poda, as feridas criadas tornam-se portas de entrada para os esporos do patógeno que ali caírem, infetando o lenho e formando cancrios. Nestes cancrios, sejam em lenha de poda ou em lenho infetado nas plantas, formam-se estruturas de hibernação, denominadas de picnídios que, no seu interior formam conídios que, quando maduros, são disseminados novamente através da água ou do vento.



**Figura 1.** Ciclo da botriosferiose (Adaptado de Gramaje & Larignon, 2015)

### 2.3. Sintomas

A botriosferiose têm diversos sintomas associados, contudo cada um deles não está associado a uma determinada espécie fúngica. Além disso, estes são facilmente confundidos com os sintomas de esca e eutipiose (Rego *et al.*, 2012). Os sintomas mais comuns são a falta de abrolhamento, ou abrolhamento deficiente na primavera (Figura 2A), sarmentos com dieback ou definhamento, necroses de botões florais (Figura 2B) e no xilema (Úrbez-Torres, 2011), e necroses nos entrenós (Figura 2C) da base do sarmento que conduzem à sua quebra ou desnoca (van Nierkerk *et al.*, 2006). Os principais sintomas de botriosferiose, observados a nível do lenho são cancros de forma alongada geométrica (Figura 2D), indistinguíveis dos cancros provocados por eutipiose e necroses de forma variável no lenho quando observados os cortes transversais (Gramaje *et al.*, 2018). No inverno, durante o repouso vegetativo, estas necroses tornam-se esbranquiçadas e sobre as mesmas diferenciam-se estruturas de frutificação globosas e negras (picnídios) nos quais se irão formar os conídios que posteriormente serão libertados (Phillips, 1998).

Os sintomas podem aparecer 1 a 2 anos após a infeção (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) e são observados, principalmente, em videiras adultas (Gramaje *et al.*, 2018).

Estes patogénios são responsáveis pelo declínio gradual do vigor e da produção da videira em todo o mundo. Por exemplo, na Austrália, nas cultivares Semillon e Dawn Seedless (uva de mesa) foram encontradas necroses internas em forma de cunha e anel e sintomas de dieback (Úrbez-Torres, 2005). Nos Estados Unidos foram observados cancros nos ramos de videiras (Úrbez-Torres *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Sintomas associados a botriosferiose observados em campo. A) Abrolhamento irregular ou inexistente; B) Murchidão dos cachos; C) Necroses nos sarmentos; D) Cancros alongados no lenho das varas.

### 2.4. Meios de Luta

A botriosferiose é de difícil controlo seja pela diversidade de espécies envolvidas na sua etiologia, seja pela falta de meios curativos. Como tal, é necessário combater preventivamente, isto é, praticando uma produção integrada com recurso a outras técnicas para além da luta química. A produção integrada é definida como um sistema de exploração agrícola que integra os recursos naturais e os

mecanismos das atividades das explorações agrícolas, tendo por objetivo reduzir ao mínimo a utilização dos produtos fitofarmacêuticos, respeitando o meio ambiente e assegurando uma produção de alta qualidade e simultaneamente contribuir para a melhoria dos rendimentos dos agricultores (Art. 5.º do Decreto-Lei 180/95 de 26 de julho).

Sendo que o principal local de infeção desta doença são as feridas, em particular as feridas de poda (Mutawila *et al.*, 2015), uma das formas de prevenção será, através da proteção das mesmas seja através de métodos físicos, como colas ou selantes, ou através de fungicidas químicos ou biológicos que protejam a ferida, ou ainda, com a combinações de diferentes métodos.

Estudos adicionais deverão ser focados no aumento do número de opções, não só químicas, mas também alternativas, como agentes de biocontrolo (BCA) e novas estratégias de produção que permitam aos produtores minimizar as aplicações de produtos químicos (Gramaje *et al.*, 2018).

Atualmente não existe nenhuma forma de controlo totalmente eficaz e, com as crescentes preocupações ambientais, há cada vez um maior interesse em alternativas aos produtos fitofarmacêuticos de modo a controlar a disseminação das DLV em vinhas de forma sustentável.

#### 2.4.1. Culturais

Os fungos causadores de DLV podem infetar a videira em qualquer altura da sua vida, seja no viveiro através das vinhas mãe de porta-enxertos e garfos, seja em vinha nova ou adulta já instalada. Atualmente, não há cura eficaz para a doença do pé negro, doença de Petri ou para a botriosferiose, o que significa que a melhor maneira para atuar perante estas doenças é a prevenção (Gramaje *et al.*, 2018).

A gestão das vinhas mãe tem sido pouco valorizada na produção de material de propagação de qualidade. As técnicas culturais utilizadas em viveiro são tão importantes como as utilizadas na exploração, porque vão influenciar a incidência de DLV e, conseqüentemente, garantir a qualidade das plantas vendidas (Gramaje *et al.*, 2018). Alguns viveiros produzem plantas-mãe para porta-enxertos com condução vertical (Gramaje & Di Marco, 2015), permitindo uma maior densidade de sarmentos e uma maior qualidade sanitária pois previne, por exemplo, a doença do pé negro, em relação à produção das plantas-mãe junto ao solo. No entanto a manutenção é mais dispendiosa e necessita de maior mão de obra (Hunter *et al.*, 2004; Waite *et al.*, 2015).

Uma técnica bastante utilizada para reduzir a quantidade de infeção na vinha é o corte e retirada da vinha das varas infetadas de modo a reduzir a disseminação e a infeção do patogénio. Esta prática de remoção de madeira infetada também é aplicável à lenha de poda que pode ser fonte de inóculo para a propagação da doença (Elena & Luque, 2016). Esta madeira retirada deve, por isso, ser queimada ou utilizada para compostagem (Gramaje *et al.*, 2018).

O método de rega também pode influenciar a dispersão do patógeno, por exemplo, a rega por aspersão pode levar à libertação de esporos de *Botryosphaeriaceae* (Gubler *et al.*, 2013).

Nos viveiros vitícolas, o período considerado com sendo o mais crítico para a propagação de DLV é durante o processo de enxertia, pois é nesta fase do processo de produção de enxertos prontos que o porta-enxerto e o garfo apresentam os cortes mais ativos e, a presença de feridas contaminadas à partida ou uma má ligação de enxertia tornam-se mais facilmente vulneráveis a entrada de DLV (Gramaje & Armengol, 2011). Por vezes, a contaminação poderá provir ainda da máquina de enxertia (Agustí-Brisach & Armengol, 2013), devendo-se ao facto de material infetado ter sido enxertado e não se ter procedido à correta limpeza e desinfeção da máquina de enxertia antes de enxertar material limpo. As câmaras de calogénese, onde se utilizam temperaturas altas, humidade elevada e obscuridade podem conduzir à fragilidade da zona de enxertia, tornando-a mais suscetível a infeções (Hartmann *et al.*, 2001; Waite *et al.*, 2015). Assim sendo, é da maior importância manter a higienização das câmaras para tentar controlar ou diminuir a propagação de patógenos responsáveis por DLV (Gramaje *et al.*, 2018).

Outro método também disponível para o controlo das DLV em viveiros, é o Tratamento com Água Quente (TAQ) ao porta-enxerto antes da enxertia ou aos enxertos prontos (Halleen & Fourie, 2016), que permite eliminar bactérias como *Xylella fastidiosa* (doença de Pierce) ou fitoplasmas (flavescência dourada) (Waite & May, 2005; EFSA Panel on Plant Health, 2015) e controlar alguns agentes causais de doenças do lenho (Gramaje *et al.*, 2010). Este método passa por submergir as videiras enxertadas em água a 50°C durante 30 minutos (Waite & May, 2005). Estudos realizados na Nova Zelândia e em Espanha levaram à conclusão de que a temperatura necessária seria de 48°C durante 30 minutos para climas mais frios e de 53°C durante 30 minutos para climas quentes (Gramaje *et al.*, 2014; Billones-Baaijens *et al.*, 2015). Tais estudos levam a crer que videiras de climas quentes tolerem temperaturas mais elevadas do que videiras de climas frios (Crocker *et al.*, 2002). Contudo, o controlo de patógenos de doenças do lenho não é 100% eficaz, uma vez que as práticas de armazenamento deste material incluem armazenamento em câmara fria após TAQ, o que provoca atrasos na calogénese da enxertia, atrasos no desenvolvimento ou até morte de gomos em estacas de videiras enxertadas (Gramaje *et al.*, 2018) e atrasos na formação de raízes (Waite & May, 2005).

#### 2.4.2. Químicos

A luta química utiliza substâncias químicas, naturais ou de síntese, de modo a reduzir ou eliminar as populações de inimigos das culturas, estas substâncias químicas são denominadas por pesticidas (Amaro, 2003). No entanto, os pesticidas de uso agrícola, designados por produtos fitofarmacêuticos, têm diversos tipos de pesticidas consoante o inimigo a combater (Amaro, 2003). Deste modo, os

fungicidas são sobretudo utilizados para combater fungos através da prevenção ou do retardamento do seu desenvolvimento (Guia do Produtos fitofarmacêuticos, 2016)

Os fungicidas podem ser orgânicos de síntese ou inorgânicos. Dentro dos fungicidas inorgânicos encontrava-se o arsenito de sódio que em tempos era o mais utilizado para combater a botriosferiose e a esca na vinha e um dos mais eficazes, no entanto, era prejudicial para a saúde humana, uma vez que era cancerígeno, e para o meio ambiente (Bertsch *et al.*, 2013; Mondello *et al.*, 2019). Após este ser banido em 2003 (Fontaine *et al.*, 2016; Gramaje *et al.*, 2018; Songy *et al.*, 2019), foram aparecendo outras produtos comerciais. Atualmente, não há no mercado tratamento curativo para as doenças do lenho. Existe, contudo, proteção química e física – químico que atuam preventivamente nas feridas de poda.

Segundo Gramaje *et al.* (2018) os produtos mais eficazes contra a botriosferiose são o benomil, o carbendazime e o triptofano de metilo. Estes fungicidas líquidos tornavam a aplicação mais rápida e fácil (Sosnowski & McCarthy, 2017), mas são facilmente laváveis pela chuva (Bertsch *et al.*, 2013). No entanto, tal como o arsenito de sódio, o benomil e os produtos à base de carbendazime também já foram banidos do mercado, havendo cada vez menos meios de luta químicos à disposição do agricultor que sejam eficazes, rápidos e fáceis de aplicar e sobretudo acessíveis economicamente (Mondello *et al.*, 2019).

Uma alternativa seria haver aplicação de fungicidas mais eficiente através de aplicação local, isto é, aplicação específica na ferida de poda, havendo um menor gasto de fungicida por hectare. Um dos problemas com a proteção química de feridas de poda passa por possuírem um tempo reduzido de eficácia pois a ferida pode demorar 4 a 16 semanas a ficar completamente cicatrizada (Van Niekerk *et al.*, 2011), o que poderá levar à necessidade de fazer múltiplas aplicações de modo a atingir um período de tempo maior de eficácia (Munkvold & Marois, 1993a), sendo pouco prático para os vicultores (Bertsch *et al.*, 2013). Deste modo, o mais prático seria haver uma formulação eficaz que pudesse ser aplicada por pulverização, mas esta forma de aplicação é facilmente lixiviada pela precipitação (Bertsch *et al.*, 2013).

Pode-se conjugar a aplicação localizada de uma barreira física, que protege a ferida da infeção de patogénios, com um fungicida que atuará contra o patogénio (Sosnowski *et al.*, 2013). Um exemplo deste tipo de produto é o Tessior®, mistura de piraclostrobina + boscalide + polímero selante, formulação desenvolvida recentemente e homologada em diversos países da Europa, cuja aplicação é feita por jato de pistola diretamente sobre a superfície da ferida (Zappata *et al.* 2018). Esta sistema é muito mais dispendioso do que a aplicação de um fungicida por pulverização pois necessita de mão de obra e de equipamento especializado (Sosnowski & McCarthy, 2017).

Outra alternativa seria o recurso a nanotecnologia aplicada a um fungicida. Segundo Battiston (2018) a nanotecnologia é utilizada na agricultura para melhoramento da produtividade e da qualidade da

cultura e para controlo de doenças. O desenvolvimento de sistemas de libertação lenta de pesticidas seria uma forma de reduzir a quantidade de substância ativa aplicada, tornando a sua aplicação mais eficiente. Além disso, as nanopartículas podem incorporar pesticidas, fertilizantes, entre outras substâncias (Ghormade *et al.*, 2011).

Um exemplo deste tipo de produto é um fungicida à base de nanopartículas de cobre, CA3356 da Natural Development Group® (NDG), que está a ser testado contra doenças do lenho (Battiston, 2018). Numa tentativa de reduzir o uso de fungicidas e de encontrar novas formas de proteção que estejam disponíveis para os viticultores, há a necessidade de testar novos produtos sejam eles com uma ou múltiplas formas de ação.

#### 2.4.3. Biológicos

Em alternativa aos produtos fitofarmacêuticos, que podem ter efeitos negativos na saúde humana e no meio ambiente, há certos agentes de controlo biológico (BCA) que estão a ser testados como combate preventivo. A utilização de BCA é baseada na capacidade de microrganismos colonizarem as feridas e os tecidos e, conseqüentemente, assegurarem uma proteção mais longa.

Determinados fungos e bactérias podem ser utilizados como controlo de DLV, uma vez que colonizam a planta ocupando o espaço reservado aos patogénios e consumindo os recursos necessários ao desenvolvimento de certas doenças. Já existem produtos à base de espécies de *Trichoderma* que são comercializadas, como é o caso de *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. gamsii*, os quais tem alguma eficácia (Costa, 2018; Mondello *et al.*, 2018). Estudos efetuados mostraram que têm efeito duradouro pois após a aplicação colonizam o lenho da planta e induzem resistência sistémica da planta a diversos patogénios. Tal, permite que ocorra uma menor incidência da doença através do desencadeamento da resistência da planta a stresses bióticos e abióticos provocados por DLV (Spagnolo, 2014, 2017; Pinto *et al.*, 2018). Desde 2000, diversos BCA têm vindo a ser testados contra vários patogénios de DLV e os mais eficientes, até à data, são os fungos e bactérias que sejam antagonistas, isto é, no local onde estas proliferaram, o patogénio encontrará maior dificuldade em proliferar (Haidar *et al.*, 2016; Mondello *et al.*, 2018). Contudo, o período de colonização necessário a estes agentes de controlo biológico pode criar um período de suscetibilidade da planta a outros patogénios (Mutawila *et al.*, 2015). Este período pode durar entre 1 e 2 semanas, dependendo do tempo de colonização do BCA. De entre os patogénios já utilizados, *Trichoderma* spp. mostrou-se bastante eficaz no controlo de espécies como *D. seriata* ou *L. theobromae* (Kotze *et al.*, 2011), existindo por isso já várias formulações baseadas em espécies deste género disponíveis no mercado e homologadas para proteção de feridas de poda.

### 3. Objetivos

Sendo a botriosferiose considerada uma das DLV com maior expressão em Portugal e perante uma realidade em que o número de substâncias ativas fungicidas existentes no mercado é cada vez menor, associado a uma maior preocupação com questões ambientais e de saúde humana, é de enorme importância investigar novas e melhores soluções para o controlo desta doença.

Como já referido, até à data, não há nenhum método curativo disponível na Europa para controlar as DLV desde que foi banido o arsenito de sódio no início do século XXI (Mondello *et al.*, 2018) e, as experiências feitas com fungicidas não levaram a resultados totalmente satisfatórios de produtos com ação curativa ou preventiva de DLV incluindo a botriosferiose, sendo necessário testar novos produtos de modo a encontrar novas e sustentáveis soluções para controlar esta doença.

Assim sendo, esta dissertação tem como objetivo o estudo e identificação de isolados da família *Botryosphaeriaceae*, obtidos a partir de material infetado proveniente de vinhas sintomáticas na região centro de Portugal, assim como o estudo de novas formas de controlo destes agentes causais de botriosferiose, com especial incidência para o género *Lasiodiplodia*. Espécies deste género têm sido isoladas com crescente frequência em zonas da bacia do mediterrâneo, e atualmente, não existe qualquer tipo de estudo relativamente ao seu controlo. Ao longo deste trabalho foram testados e comparados três produtos diferentes, contra duas espécies de *Lasiodiplodia* spp., nomeadamente *L. theobromae* e *L. mediterranea*: o ESQUIVE® (Agrauxine), uma formulação de *Trichoderma atroviride* estirpe I-1237, o Tessior® (BASF), que é uma formulação química constituída por uma mistura de boscalide com piraclostrobina e um polímero que age como selante de feridas de poda e o CA3356 (NUFARM – Natural Development Group®), que é um produto à base de nanopartículas de cobre com efeito elicitor. Também foi feita a caracterização cultural e identificação molecular e testes de patogenicidade de modo a conhecer melhor as espécies em estudo.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Caracterização de isolados de Botryosphaeriaceae

#### 4.1.1. Isolados

Os isolados foram obtidos a partir de material vegetal com sintomas de botriosferiose recolhido em diversas vinhas localizadas nas regiões de Lisboa, Ribatejo e Alto Alentejo durante o ano de 2018. Este material apresentava sintomas de necroses em sarmentos, inflorescências e flores a partir dos quais foram realizados isolamentos microbiológicos.

Foram retiradas várias amostras de material sintomático, as quais foram desinfetadas em hipoclorito de sódio a 7%, lavadas em água destilada e esterilizada e colocadas em placas de Petri contendo gelose de batata dextrosada (PDA, Difco, E.U.A., BD) complementado, após autoclavagem, com 250mg/L de cloranfenicol (BioChemica, AppliChem, Alemanha). Após incubação durante uma semana a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , na obscuridade, as placas foram observadas para deteção da presença de fungos da família Botryosphaeriaceae. Estas colónias foram repicadas para novas placas de Petri contendo PDA, as quais foram incubadas nas condições acima referidas.

Os isolados obtidos foram purificados através do método de hifa única sendo repicados para placas de Petri de 90 mm contendo água de agar a 2% (Difco, E.U.A., BD) incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 2 dias. Com recurso ao auxílio de lupa binocular (Leica MZ 125) com uma ampliação de 20 $\times$ , foi cortada a ponta de uma única hifa que foi colocada em placa de Petri contendo PDA. Os isolados assim obtidos foram colocados em tubos de ensaio com meio PDA inclinado e adicionados à coleção do Instituto Superior de Agronomia. No Quadro 1 apresenta-se a identificação dos 23 isolados assim obtidos.

Por forma a criar uma descrição mais abrangente das espécies mais representativas de Botryosphaeriaceae, responsáveis pela botriosferiose da videira, em Portugal, foram incluídos 7 isolados de *Lasiodiplodia* spp., sendo quatro de Portugal (Rego *et al.*, 2010), dois do Peru e um da coleção do “Centralbureau voor Schimmelcultures”, Utrecht, Holanda (CBS), que se encontram no Quadro 2.

**Quadro 1.** Identificação dos isolados de *Botryosphaeria* spp. (Bt.) em estudo: código, referência do isolado, cultivar, local de colheita e região de isolamento.

<b>Código</b>	<b>Ref. isolado</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Local de colheita</b>	<b>Região de isolamento</b>
<b>Bt.201</b>	BAS020 2	Seara Nova	ACV Cadaval	Ápice do sarmento
<b>Bt.202</b>	BAS017 4	Alicante	AVA Alenquer	Base do sarmento
<b>Bt.203</b>	BAS006 3	Castelão	AVIPE Montijo	Ráquis
<b>Bt.204</b>	BAS047 3	Syrah	ATEVA Redondo	Base do sarmento
<b>Bt.205</b>	BAS017 7 (1)	Castelão	AVA Alenquer	Cacho
<b>Bt.206</b>	BAS017 1	Castelão	AVA Alenquer	Pedúnculo da folha
<b>Bt.207</b>	BAS006 15	Castelão	AVIPE Montijo	Base do sarmento
<b>Bt.208</b>	BAS001 3	Aragonez	AVIPE Montijo	Ápice do sarmento
<b>Bt.209</b>	BAS007 3	Aragonez	AVIPE Montijo	Ráquis
<b>Bt.210</b>	BAS017 9	Castelão	AVA Alenquer	Ápice do sarmento
<b>Bt.211</b>	BAS041 6	Arinto	AATV Loures	Base do sarmento
<b>Bt.212</b>	BAS003 5	Castelão	AVIPE Montijo	Base do sarmento
<b>Bt.213</b>	BAS020 2(2)	Seara Nova	ACV Cadaval	Ápice do sarmento
<b>Bt.214</b>	BAS003 2	Castelão	AVIPE Montijo	Ápice do sarmento
<b>Bt.215</b>	BAS018 4	Seara Nova	AVA Alenquer	Ráquis
<b>Bt.216</b>	BAS006 12	Alicante	AVIPE Montijo	Ápice do sarmento
<b>Bt.217</b>	BAS001 2	Aragonez	AVIPE Montijo	Ápice do sarmento
<b>Bt.218</b>	BAS007 6	Aragonez	AVIPE Montijo	Base do sarmento
<b>Bt.219</b>	BAS017 7	Alicante	AVA Alenquer	Ráquis
<b>Bt.220</b>	BAS020 1(1)	Seara Nova	ACV Cadaval	Base do sarmento
<b>Bt.221</b>	BAS020 2(1)	Seara Nova	ACV Cadaval	Ápice do sarmento
<b>Bt.222</b>	BAS003 2(1)	Castelão	AVIPE Montijo	Ápice do sarmento
<b>Bt.223</b>	BAS017 8	Alicante	AVA Alenquer	Ráquis

**Quadro 2.** Identificação dos isolados de referência de *Botryosphaeria* spp.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Região, País</b>
<b>CBS 124060</b>	<i>Lasiodiplodia mediterranea</i>	2008	Sicília, Itália
<b>Bt.102</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2009	Algarve, Portugal
<b>Bt.103</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2009	Estremadura, Portugal
<b>Bt.105</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2009	Alentejo, Portugal
<b>Bt.106</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2009	Península de Setúbal, Portugal
<b>V3</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		Peru
<b>V15</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		Peru

#### 4.1.2. Caracterização cultural e morfológica

Para proceder à caracterização cultural dos isolados em estudo, foram cortados da margem ativa de crescimento micelial de cada isolado discos com 3mm de diâmetro, com recurso a um anel de corte e, foram colocados em placas de Petri com 90 mm contendo PDA. Posteriormente, estas placas foram colocadas numa estufa a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  durante 10 dias em obscuridade. Após este período, a caracterização cultural foi feita tendo em consideração os seguintes parâmetros: aspeto cultural, densidade da colónia, coloração, frente de crescimento, aspeto à transparência e zonagem. Estas observações foram feitas tanto a nível da face superior como da face inferior para um total de 30 isolados (Quadros 1 e 2) (Rego et al. 2010).

A caracterização morfológica foi obtida a partir de 30 culturas (Quadros 1 e 2) que cresceram em solução de Agar (Difco BD, E.U.A.) a 1,5% com agulhas de pinheiro (*Pinus pinea*) em placas de Petri com 60 mm de diâmetro à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  com ciclo de 12h de fotoperíodo de luz branca e 12 h de obscuridade em estufa “Panasonic MIR154-PE” (Panasonic, Japão). Cerca de 1 mês depois, foram efetuadas preparações das estruturas vegetativas de cada isolado, entre lâmina e lamela coradas com uma mistura de azul de algodão com lactofenol e observadas ao microscópio ótico “Leica DM2500” (Leica, Wetzlar, Alemanha) com uma ampliação de 400x. Para cada isolado foram fotografados 20 esporos aleatoriamente com recurso à lente “Leica DFC295” e ao programa “Leica Suite v. 3.16” e avaliado o comprimento e a largura calculada a média e o desvio padrão de cada isolado (Rego et al. 2010).

As caracterizações cultural e morfológica foram realizadas apenas para 26 dos 30 isolados, pois quando se iniciou esta etapa percebeu-se que os tubos de coleção dos isolados (Bt.210, Bt.219, Bt.220 e Bt.222) estavam contaminados. Contudo, para identificação molecular das espécies ainda foi possível extrair o DNA.

#### 4.1.3. Caracterização molecular

Antes da extração do DNA, as culturas foram colocadas a crescer na estufa a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias em placas de 90mm contendo PDA de modo a ser possível obter a quantidade de micélio fresco necessário à extração do seu DNA. Para se poder proceder à caracterização molecular dos 30 isolados, foi necessário efetuar extração de DNA, utilizando para isso uma adaptação do protocolo usado com o kit de extração DNeasy™ Plant Minikit da Qiagen® (Venlo, Países Baixos) que se encontra no anexo 1. Após a extração foi feita a quantificação do DNA dos isolados usando o programa “Gene5 2.03” juntamente com o nanodrop “BioTek® Take 3” (BioTek® instruments inc., Vermont, E.U.A.). Posteriormente, para verificar o sucesso das extrações foi efetuado um gel de agarose 1% preparado com TBE 0,5X e 3µL de GreenSafe Premium (Nzytech, Lisboa, Portugal). Em cada poço foram colocados 2µL de solução de DNA com 2 µL de azul de bromofenol. A eletroforese decorreu numa tina horizontal de 20 x 25 cm (“Horizon 20-25, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies/GibcoBRL”) durante 30 minutos a 120 V (Volt) tendo sido utilizado como tampão da eletroforese TBE 0,5X. De modo a tornar a comparação mais fácil foi utilizada Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Canadá). Os resultados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta de 312 nm “BTX 20.M, UVItec Limited” e registados com recurso a uma impressora térmica “Mitsubishi model P91E”. De seguida, e dado que não era conhecida a identificação das espécies dos isolados em estudo, procedeu-se à tipagem do DNA extraído (Universidade de Aveiro), por forma a distinguir quais os grupos de espécies representativos dentro da amostra em estudo. Para isso, as amostras foram amplificadas através de uma reação PCR. Cada amplificação foi realizada em 25µL de amostra cuja mistura de reação pode ser encontrada no Quadro 3 e o primer utilizado foi o  $(\text{GTC})_5 = \text{GTCGTCGTCGTCGTC}$  (Alves *et al.*, 2007). Como controlo negativo utilizou-se a mesma mistura, mas foi usada água miliQ em substituição do DNA.

**Quadro 3.** Composição da mistura de reação do PCR utilizada na tipagem.

<b>Mistura da reação</b>		
	<b>1 tubo</b>	<b>26 tubos</b>
<b>Primer: <math>(\text{GTC})_5</math> (microssatélite)</b>	2 µL	52 µL
<b>Taq</b>	6,25 µL	162,5 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	15,75 µL	409,5 µL
<b>DNA</b>	1 µL	
<b>Total</b>	25 µL	

O programa de amplificação usado foi o seguinte: desnaturação a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C e finalmente 16 minutos a 65°C. Os produtos obtidos na amplificação por PCR foram separados em gel de agarose 1,5% com tampão TAE (350 ml), durante 5 horas, a 80 V. Estes resultados foram posteriormente processados com recurso ao programa Gel Compar II, do qual se obteve um dendrograma que permitiu ver a proximidade dos isolados em termos de semelhança genética.

Posteriormente realizou-se a amplificação e sequenciação das regiões do ITS (Internal Transcribed Spacer) e de parte do fator de alongação 1 $\alpha$  (EF -Elongation Factor) para proceder à correta identificação da espécie de cada isolado (Alves *et al.*, 2007).

Os primers para amplificação da região do ITS foram o ITS4 e o ITS5 (White, 1990) e os primers utilizados para amplificação de parte do EF 1 $\alpha$  foram o EF-688F e o EF-1251R (Alves, 2008). As amostras foram submetidas a uma reação de PCR sendo que cada amplificação continha 1 X PCR buffer REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, E.U.A.) com 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP mix, 0,06 unidades/ $\mu$ L de Taq Polimerase, 12,5 pmol do primer correspondente e 25-50 ng de DNA e foi realizada em 25  $\mu$ l de amostra cujas Misturas de reação pode ser encontrada nos quadros 4 e 5. Para os controlos negativos utilizou-se água destilada e esterilizada em vez de DNA em cada reação. O programa de amplificação usado para o ITS foi: desnaturação a 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 1 minuto e 40 segundos a 72°C e finalmente 10 minutos a 72°C. O programa de amplificação usado para o EF foi: desnaturação a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C e finalmente 10 minutos a 72°C. De seguida foi realizada uma eletroforese e gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5 X durante 30 minutos a 120 V numa tina horizontal de 20 x 25 cm (“Horizon 20-25, Horizontal Gel Eletrophoresis Apparatus, Life Technologies/GibcoBRL”). (Reis *et al.*, 2020)

**Quadro 4.** Composição da mistura de reação do PCR utilizada para amplificação da região do ITS (Internal Transcribed Spacer)

<b>Mistura da reação – ITS</b>		
	<b>1 tubo</b>	<b>30 tubos</b>
<b>RedTaq</b>	12,5 $\mu$ L	375 $\mu$ L
<b>ITS 5</b>	0,5 $\mu$ L	15 $\mu$ L
<b>ITS 4</b>	0,5 $\mu$ L	15 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9,5 $\mu$ L	285 $\mu$ L
<b>DNA</b>	2 $\mu$ L	
<b>Total</b>	25 $\mu$ L	

**Quadro 5.** Composição da mistura de reação do PCR utilizada para amplificação de parte da região do EF 1 $\alpha$  (Elongation Factor).

<b>Mistura da reação – EF</b>		
	<b>1 tubo</b>	<b>30 tubos</b>
<b>RedTaq</b>	12,5 $\mu$ L	375 $\mu$ L
<b>EF-688F</b>	1 $\mu$ L	30 $\mu$ L
<b>EF-1251R</b>	1 $\mu$ L	30 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9,5 $\mu$ L	285 $\mu$ L
<b>DNA</b>	1 $\mu$ L	
<b>Total</b>	25 $\mu$ L	

Estes fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Illustra™ ExoProStar™ Ezymatic PCR and Sequencing Clean-up Kit (GE Life Sciences, Reino Unido) (Anexo 2) e, posteriormente, as amostras a sequenciar foram enviadas para a STAB VIDA (Lisboa, Portugal), através dos packs YouTube It (10  $\mu$ L amostra + 3  $\mu$ L primer). Com as sequências identificadas, há que proceder à identificação das espécies. Para tal, foi utilizado o programa MEGA7, no qual foram alinhadas as sequências “forward” e “reverse”, por forma a obter uma sequência consenso. De seguida, as sequências obtidas foram comparadas com sequências de referência encontradas através de “BLAST searches” no GenBank de modo a obter a identificação da espécie.

## **4.2. Determinação da agressividade de isolados do género *Lasiodiplodia***

### **4.2.1. Material vegetal**

Para esta tarefa foram selecionados todos os isolados pertencentes ao género *Lasiodiplodia*, visto que até à data, não existem estudos sobre a sua agressividade para castas portuguesas, bem como qualquer tipo de ensaio de eficácia de fungicidas para fungos deste género.

Foram utilizadas 1.440 videiras com dois anos de idade, envasadas em sacos de 1L contendo uma mistura de terra + turfa (3:1) e leca (para melhorar a drenagem) e mantidas em estufa de campo, ventilada, sob temperaturas de 24  $\pm$  5°C/18°C (dia/noite). As castas selecionadas foram: Alvarinho, Touriga Nacional, Touriga Franca, Cabernet Sauvignon, Baga e Aragonês, tendo sido utilizadas 240 plantas de cada casta e foram inoculados os isolados: Bt.102, Bt.103, Bt.105, Bt.106, V3, V15 e CBS.

#### 4.2.2. Inoculação em plantas envasadas

Os isolados de *Lasiodiplodia* spp. foram, previamente, inoculados em placas de Petri contendo PDA, na obscuridade a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  para obtenção de crescimento micelial.

Num sarmento de cada videira foi efetuada uma ferida entre o primeiro e o segundo entrenó, com auxílio de um furador de 3mm de diâmetro de modo a retirar o ritidoma e a expor a zona cortical do sarmento. De seguida, colocou-se um disco de micélio retirado da margem das colónias com crescimento ativo de cada isolado em estudo. A região de inoculação foi envolvida em algodão humedecido em água destilada e esterilizada e selado com “Parafilm”. Foram efetuadas 30 repetições por isolado e por casta. Na testemunha foi utilizado um disco de PDA em substituição do inóculo.

O delineamento do ensaio foi completamente casualizado e as plantas inoculadas foram mantidas na estufa de campo, ventilada com temperatura média de  $24\pm 5^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$  (dia/noite), durante 4 meses.

#### 4.2.3. Observação e tratamento de dados

Numa primeira fase, cinco semanas após inoculação, foi medido o comprimento e largura da lesão externa provocada por cada isolado inoculado e, utilizando a fórmula matemática da área de uma elipse, obtida a área da lesão. Posteriormente, quatro meses após inoculação, foi avaliado o comprimento das lesões internas no lenho.

Posteriormente, foram feitos reisolamentos, por forma a recuperar os isolados que foram novamente identificados e assim, cumprir os postulados de Koch. Para isso, foram retirados 4 pedaços de material lenhoso da bordadura da região necrosada os quais foram desinfetados em hipoclorito de sódio a 7% durante 30 segundos e, posteriormente, lavados em água destilada e esterilizada por 30 segundos. Por fim, foram colocados em placas de Petri com 90mm contendo PDA suplementado com cloranfenicol (BioChemica AppliChem, Alemanha). As placas foram incubadas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , na obscuridade, durante aproximadamente uma semana e após esse período foram observadas para identificação fenotípica e molecular dos isolados inoculados.

O tratamento de dados foi efetuado com recurso ao programa estatístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Foram estabelecidos os pressupostos de uma análise de variâncias e, quando os pressupostos não foram cumpridos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis que compara os diferentes níveis do fator através de “ranks” de modo a encontrar as diferenças significativas entre estes ( $P < 0,05$ ).

### 4.3. Ensaio de fungicidas

#### 4.3.1. Instalação do ensaio

O ensaio de fungicidas foi realizado na vinha do Almotivo, na Tapada na Ajuda no Instituto Superior de Agromnomia, nas castas tintas Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon. Foram testados dois produtos de proteção de feridas de poda: Esquive® e Tessior®, extremes ou em combinação com um terceiro:

CA3356, de aplicação por pulverização a toda a planta. O ensaio foi totalmente casualizado e as cores utilizadas para cada tratamento ou tratamento apresentam-se no quadro 6.

**Quadro 6.** Tratamentos, Produtos, Inóculo e cores utilizadas no ensaio de campo.

Tratamentos	Produto	Inóculo	Cores do ensaio
1	Esquive®	Água (C. <sup>a</sup> )	Verde & Amarelo
2	Esquive®	<i>L. theobromae</i> (PT <sup>b</sup> ) Bt.105	Verde & Amarelo + Vermelho
3	Esquive®	<i>L. theobromae</i> (PE <sup>c</sup> ) V3	Verde & Amarelo + Azul
4	Esquive®	<i>L. mediterranea</i> CBS	Verde & Amarelo + Cinza
5	Esquive® + CA3356	Água (C.)	Branco + Verde & Amarelo
6	Esquive® + CA3356	<i>L. theobromae</i> (PT) Bt.105	Branco + Vermelho
7	Esquive® + CA3356	<i>L. theobromae</i> (PE) V3	Branco + Azul
8	Esquive® + CA3356	<i>L. mediterranea</i> CBS	Branco + Cinza
9	Tessor®	Água (C.)	Preto
10	Tessor®	<i>L. theobromae</i> (PT) Bt.105	Vermelho
11	Tessor®	<i>L. theobromae</i> (PE) V3	Azul
12	Tessor®	<i>L. mediterranea</i> CBS	Cinza
13	Tessor® + CA3356	Água (C.)	Preto + Branco
14	Tessor® + CA3356	<i>L. theobromae</i> (PT) Bt.105	Preto + Vermelho
15	Tessor® + CA3356	<i>L. theobromae</i> (PE) V3	Preto + Azul
16	Tessor® + CA3356	<i>L. mediterranea</i> CBS	Preto + Cinza
17	C. inoculado e nt <sup>d</sup>	<i>L. theobromae</i> (PT) Bt.105	Laranja
18	C. inoculado e nt	<i>L. theobromae</i> (PE) V3	Verde
19	C. inoculado e nt	<i>L. mediterranea</i> CBS	Amarelo

<sup>a</sup>. Controlo; <sup>b</sup>. Portugal; <sup>c</sup>. Perú; <sup>d</sup> não tratado.

Nas linhas usadas em cada casta, indicadas no Quadro 7, foram assinalados os locais de inoculação e tratamento, aleatoriamente, de modo a seguir o esquema do Quadro 6. A localização das linhas está representada na Figura 3.

**Quadro 7.** Cultivares, produtos utilizados e linhas da vinha tratadas.

<b>Cultivar</b>	<b>Produto</b>	<b>Linhas tratadas</b>
<b>Cabernet Sauvignon</b>	Esquive® + CA3356	L13, L14, L15, L16
	Tessor®	
	Esquive®	L6 + 7 plantas L17
	Tessor®	10 plantas L17 + L18, L19
<b>Touriga Nacional</b>	Esquive® + CA3356	L13, L14, L15
	Tessor®	
	Esquive®	L16, L17
	Tessor®	L18, L19



**Figura 3.** Foto aérea da vinha do Almotivo no ISA com as linhas de cada casta delineadas a vermelho: A) Touriga Nacional e B) Cabernet Sauvignon.

#### 4.3.2. Descrição do ensaio

Neste ensaio foram testados dois produtos para proteção de feridas de poda: *Trichoderma atroviride* strain I-1237 (Esquive®, Agrauxine, Anexo 3) e boscalide + piraclostrobina+ polímero selante (Tessor®, BASF, Anexo 4); e um novo produto constituído por nano partículas de cobre, com capacidade fungicida (CA3356, Nufarm). Estes produtos para proteção de feridas de poda foram aplicados extremes, ou em combinação com o produto CA3356. Todos os produtos foram aplicados de acordo com as concentrações e calendarização recomendadas pelos fabricantes (Quadro 8). As feridas de podas foram posteriormente inoculadas com três isolados de *Lasiodiplodia* sp.: *Lasiodiplodia theobromae*– Isolado em Portugal (Bt105), *Lasiodiplodia theobromae*– Isolado no Peru (V3) e *Lasiodiplodia mediterranea* – CBS strain (CBS). Os diferentes tratamentos definidos para este ensaio de fungicidas podem ser encontrados no Quadro 6.

**Quadro 8.** Produtos, época de aplicação, concentração de substância ativa e data de aplicação.

Produto	Aplicação	Concentração/dose	Data de aplicação
Esquive®	Após poda	27g/l <sup>a</sup>	19/02/2019
Tessor®	Após poda	15g/l <sup>b</sup>	19/02/2019
CA3356	Imediatamente após vindima	400l/ha	13/11/2018
	Após poda (Inverno)	250l/ha	18/02/2019
	4 folhas	250l/ha	02/04/2019
	Poda de Verão	400l/ha	12/06/2019
	Pintor	400l/ha	24/07/2019

<sup>a</sup> - 4kg/ha com 150l de água/ha, <sup>b</sup> – a ser aplicado usando o protótipo da BASF

Para todas as modalidades de tratamento, as feridas de poda foram inoculadas com 40 µL da respetiva suspensão de esporos e nos controlos foram colocados 40 µL de água destilada e esterilizada. Estas soluções de esporos foram obtidas através das culturas dos isolados Bt.105, V3 e CBS, que cresceram em solução de Agar (Difco BD, E.U.A.) a 1,5% com agulhas de pinheiro (*Pinus pinea*) em placas de Petri com 60 mm de diâmetro à temperatura de 25±1°C com ciclo de 12h de radiação com luz branca e 12h de escuridão em estufa “Panasonic MIR154-PE” (Panasonic, Japão). Ao fim de cerca de 30 dias os picnídios foram retirados das agulhas de pinheiro e foram colocados num tubo Eppendorf no qual se procedeu à libertação dos esporos com recurso à maceração dos picnídios. Posteriormente foram transferidos para um outro tubo com água e foi ajustada a concentração desejada de 10<sup>5</sup> esporos/ml (4000 esporos) recorrendo ao auxílio de um hemacitómetro.

Cada tratamento com CA3356 foi realizado no respetivo estado fenológico da videira, como é indicado no Quadro 8 e foram realizadas 10 repetições para cada tratamento, tendo sido inoculadas 160 plantas da casta Cabernet Sauvignon e 202 plantas da casta Touriga Nacional. Os produtos Esquive® e Tessior® foram aplicados após a poda e os isolados foram inoculados 24h após a aplicação dos produtos nos talões devidamente marcados.

#### 4.3.3. Observação e análise de dados

Após a vindima, foram recolhidos os talões inoculados e foram feitos reisolamentos de modo a averiguar a percentagem de *Lasioidiplodia* sp. existente por tratamento. Estes reisolamentos foram realizados cortando uma rodela da zona infetada de cada talão que foi dividida em quatro pedaços. Estes foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 7%, lavados com água destilada e esterilizada e colocados em placas de 90mm com PDA complementado com cloranfenicol (BioChemica, AppliChem, Alemanha). As placas foram incubadas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , na obscuridade durante uma semana. Após este período, as placas foram observadas e a presença dos inóculos foi registada por forma a obter percentagem de reisolamento para todas os tratamentos.

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi efetuado com recurso ao programa estatístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Por forma a tentar uma análise ANOVA foram estabelecidos os pressupostos de uma análise de variâncias e, quando estes pressupostos não foram cumpridos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis que compara os diferentes níveis do fator através de “ranks” de modo a encontrar as diferenças significativas entre estes ( $P < 0,05$ ).

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização Morfológica

A esporulação de cada isolado ocorreu em placas de Petri de 60mm de diâmetro com meio de crescimento de agar e com agulhas de pinheiro e, como é possível verificar no Quadro 9 observou-se uma grande variabilidade nas dimensões dos conídios; contudo, é possível distinguir entre três gêneros: *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum*. Os isolados da *D. seriata* têm conídios cujas dimensões rondam os (19,61) – 22,17 – 25,99 – (29,18) ± 1,12 – 1,89 µm de comprimento e (6,71) – 8,17 – 11,21 – (13,37) ± 0,56 – 1,01 µm de largura; são ovoides, longos e de extremidades arredondadas, maioritariamente asseptados e com pigmentação acastanhada. Os conídios do isolado *D. mutila* (Bt.218) são mais largos que os de *D. seriata* e rondam os (20,54-) 23,50 ± 1,41 (-25,05) µm de comprimento e (9,47-) 11,15 ± 1,57 (-16,25) µm de largura, são também corados como os de *D. seriata*, mas são uniseptados. Os isolados do género *N. parvum* têm conídios de dimensões mais reduzidas que o género *Diplodia* e rondam os (11,39) – 13,71 – 18,28 – (22,34) ± 1,02 – 1,75 µm de comprimento e (4,20) – 5,02 – 5,33 – (6,11) ± 0,31 – 0,45 µm de largura, sendo fusiformes, asseptados e hialinos. Os isolados do género *Lasiodiplodia* têm conídios que rondam os (21,35) – 23,78 – 29,57 – (33,53) ± 1,01 – 1,92 µm de comprimento e (11,02) – 14,14 – 17,15 – (19,21) ± 0,79 – 1,16 µm de largura, são ovoides de extremidades arredondadas, uniseptados e com pigmentação castanho-escura a negra, apresentando estrias longitudinais. Estas características são também visíveis na Figura 4.

**Quadro 9.** Características morfológicas dos conídios de 30 isolados de Botryosphaeriaceae, em meio de agarose a 1,5% contendo agulhas de pinheiro à temperatura de 25 ± 1°C e com um ciclo de 12h na obscuridade e 12h de luz branca.

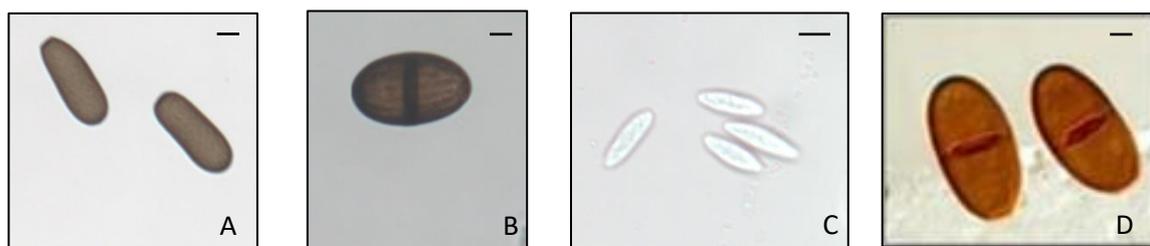
Espécie	Isolado	Dimensão dos conídios	
		Comprimento (µm)	Largura (µm)
D. seriata	Bt.201	(21,27-) 25,22 ± 1,89 (-28,69)	(8,33-) 9,91 ± 0,88 (-11,75)
	Bt.202	**	**
	Bt.203	(20,75-) 22,50 ± 1,12 (-24,23)	(6,71-) 8,17 ± 0,57 (-9,16)
	Bt.204	(20,43-) 22,65 ± 1,56 (26,20)	(7,83-) 9,06 ± 0,76 (-10,93)
	Bt.206	(20,99-) 23,84 ± 1,52 (-26,36)	(7,71-) 9,23 ± 0,95 (-10,77)
	Bt.207	(19,61-) 23,58 ± 1,95 (-27,30)	(7,49-) 9,29 ± 0,81 (-11,26)
	Bt.208	(21,72-) 25,26 ± 1,41 (-28,63)	(9,53-) 11,13 ± 1,01 (-13,37)
	Bt.209	(19,61-) 22,17 ± 1,52 (-24,53)	(7,20-) 9,07 ± 0,78 (-10,55)

\*) os valores entre parêntesis correspondem aos valores mínimos e máximos, enquanto que o valor intermédio corresponde à média, ± o desvio padrão. As médias derivam da observação de 30 conídios por isolado \*\*) não determinados; \*\*\*) não esporulou.

**Quadro 9.** Características morfológicas dos conídios de 30 isolados de Botryosphaeriaceae, em meio de agarose a 1,5% contendo agulhas de pinheiro à temperatura de 25±1°C e com um ciclo de 12h na obscuridade e 12h de luz branca (cont.)

Espécie	Isolado	Dimensão dos conídios*	
		Comprimento (µm)	Largura (µm)
<i>D. seriata</i>	Bt.210	**	**
	Bt.212	(21,27-) 23,91 ± 1,36 (-26,22)	(7,34-) 8,34 ± 0,60 (-9,36)
	Bt.213	(23,28-) 25,99 ± 1,58 (-29,18)	(7,73-) 9,03 ± 0,56 (-9,84)
	Bt.214	***	***
	Bt.215	(21,02-) 24,58 ± 1,47 (-26,99)	(10,14-) 11,21 ± 0,66 (-12,83)
	Bt.220	**	**
	Bt.221	(20,80-) 23,28 ± 1,35 (-25,53)	(8,59-) 9,99 ± 0,60 (-11,10)
	Bt.222	**	**
	Bt.223	(21,42-) 22,94 ± 1,34 (-26,37)	(8,97-) 9,72 ± 0,66 (-11,40)
<i>N. parvum</i>	Bt.205	(15,51-) 17,18 ± 1,02 (-19,92)	(4,56-) 5,22 ± 0,43 (-6,11)
	Bt.211	(15,62-) 18,28 ± 1,75 (-22,34)	(4,73-) 5,33 ± 0,31 (-5,94)
	Bt.216	(11,39-) 13,71 ± 1,28 (-16,13)	(4,20-) 5,02 ± 0,45 (-6,02)
	Bt.217	***	***
	Bt.219	**	**
<i>D. mutila</i>	Bt.218	(20,54-) 23,50 ± 1,41 (-25,05)	(9,47-) 11,15 ± 1,57 (-16,25)
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	Bt.102	(25,83-) 28,67 ± 1,39 (-31,51)	(15,43-) 16,88 ± 0,90 (-18,55)
	Bt.103	(26,30-) 29,57 ± 1,92 (-33,53)	(14,99-) 17,15 ± 1,03 (-19,21)
	Bt.105	(24,20-) 27,26 ± 1,90 (-30,45)	(15,14-) 16,13 ± 0,63 (-17,44)
	Bt.106	(26,92-) 28,47 ± 1,01 (-30,75)	(15,00-) 16,62 ± 0,79 (-18,30)
	V3	(21,35-) 23,78 ± 1,90 (-28,61)	(11,02-) 14,14 ± 1,16 (-16,37)
	V15	(23,42-) 25,43 ± 1,13 (-28,31)	(12,61-) 14,61 ± 1,02 (-15,97)
	CBS 124046	(26,01-) 29,04 ± 1,66 (-31,65)	(15,10-) 17,09 ± 0,99 (-18,88)

\*) os valores entre parêntesis correspondem aos valores mínimos e máximos, enquanto que o valor intermédio corresponde à média, ± o desvio padrão. As médias derivam da observação de 30 conídios por isolado \*\*) não determinados; \*\*\*) não esporulou.



**Figura 4.** Conídios dos isolados de Botryosphaeriaceae em estudo: A) conídios de *Diplodia seriata*, B) conídios de *Lasiodiplodia* sp., C) conídios de *Neofusicoccum parvum*, D) conídios de *Diplodia mutila* (Barra de escala = 10  $\mu$ m).

## 5.2. Caracterização Cultural

As características culturais dos 30 isolados de Botryosphaeriaceae foram obtidas em meio de PDA após 10 dias de incubação a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , na obscuridade. De acordo com as características dos isolados em estudo e dos isolados de referência, constituíram-se seis grupos de colónias cujas características estão descritas no Quadro 10 e podem ser observadas na Figura 5.

As colónias dos Grupos I, II, III e VI apresentaram bastante semelhantes com aspeto cultural cotonoso e, com micélio aéreo, densidade da colónia média a forte para o Grupo I e, forte para os restantes grupos, frente de crescimento regular, aspeto à transparência homogéneo, zonagem ausente e face inferior de cor negra, exceto no Grupo III em que a face inferior tem coloração bege a negra. A diferença relevante entre os quatro grupos é a coloração da face superior, que é cinzenta clara a cinzenta para os Grupos I e VI, branca acinzentada para o Grupo II e bege a cinzenta clara para o Grupo III.

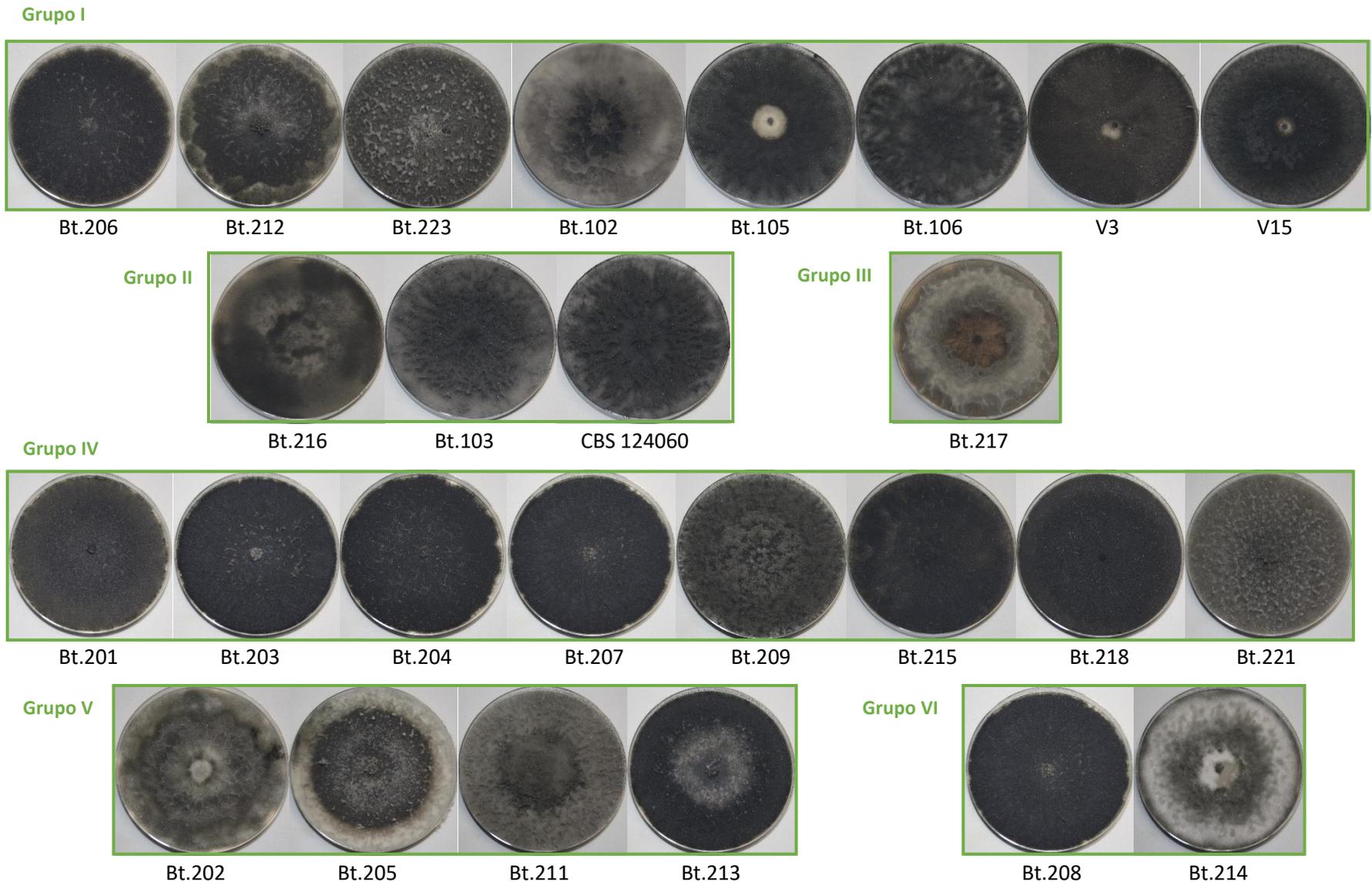
As colónias do Grupo IV apresentaram um aspeto cultural feltroso com densidade de colónia forte, coloração cinzenta a negra, frente de crescimento regular, aspeto à transparência homogéneo, zonagem ausente e face inferior com coloração negra.

As colónias do Grupo V tem um aspeto cultural intermédio, uma vez que é feltroso a cotonoso, com densidade de colónia média a forte, frente de crescimento regular, aspeto à transparência homogéneo, zonagem ausente e face inferior com coloração negra.

**Quadro 10.** Características culturais de 30 isolados de *Botryosphaeriaceae* (Bt.) em PDA ao fim de 8 dias em condições de obscuridade e à temperatura de 25±1°C.

Grupos	Isolados	Face Superior					Face Inferior	
		Aspeto Cultural	Densidade da colónia	Coloração	Frente de Crescimento*	Aspeto à transparência	Zonagem	
I	Bt.206, Bt.212, Bt.223, Bt. 102, Bt. 105, Bt. 106, V3 e V15	Cotonoso, com micélio aéreo	Média a forte	Cinzento claro a cinzento	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: negra
II	Bt.216, Bt.103 e CBS 124060	Cotonoso, com micélio aéreo	Forte	Branco acinzentado	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: negra
III	Bt.217	Cotonoso, com micélio aéreo	Forte	Bege a cinzento claro	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: bege a negra
IV	Bt.201, Bt.203, Bt.204, Bt.207, Bt.209, Bt.215, Bt.218 e Bt.221	Feltroso, com micélio aéreo	Forte	Cinzento a negro	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: negra
V	Bt.202, Bt.205, Bt.211, Bt.213	Feltroso a cotonoso, com micélio aéreo	Média a forte	Cinzento claro	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: cinzenta a negra
VI	Bt.208, Bt.214	Cotonoso, com micélio aéreo	Forte	Cinzento claro a Cinzento	Regular	Homogéneo	Ausente	Idem face superior exceto na cor: cinzenta claro a negra

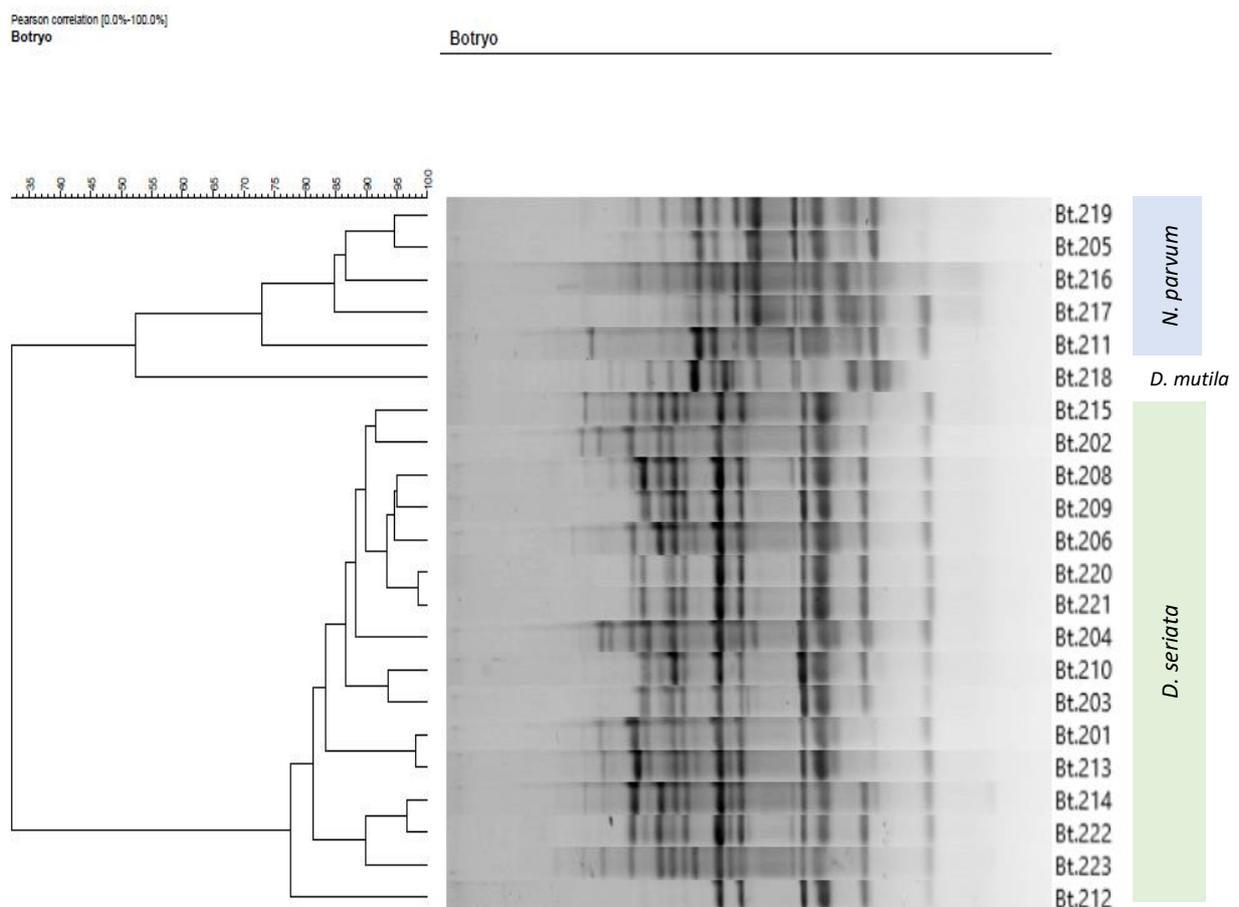
\* - característica avaliada ao fim de 5 dias



**Figura 5.** Culturas de Botryosphaeriaceae (Bt.) em meio de PDA ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25±1°C: **Grupo I:** Bt.206, Bt.212, Bt.223, Bt.102, Bt.105, Bt.106, V3, V15; **Grupo II:** Bt.216, Bt.103, CBS 124060; **Grupo III:** Bt.217; **Grupo IV:** Bt.201, Bt.203, Bt.204, Bt.207, Bt.209, Bt.215, Bt.218, Bt.221; **Grupo V:** Bt.202, Bt.205, Bt.211, Bt.213; **Grupo VI:** Bt.208, Bt.214.

### 5.3. Caracterização Molecular

Os resultados da tipagem do DNA dos isolados Bt.201 a Bt.223 realizada na Universidade de Aveiro apresentam-se na Figura 6. No dendrograma obtido foi possível detetar dois grandes grupos de isolados e um isolado que fica à parte destes dois grandes grupos. O primeiro grupo é composto pelos isolados Bt.219, Bt.205, Bt.216, Bt.217 e Bt.211 que foram identificados como sendo da espécie *N. parvum* (Quadro 11) e um segundo grupo, apenas composto pelo Bt.218, foi identificado como sendo *D. mutila* (Quadro 11). O terceiro grupo, composto pelos isolados Bt.215, Bt.202, Bt.208, Bt.209, Bt.206, Bt.220, Bt.221, Bt.204, Bt.210, Bt.203, Bt.201, Bt.213, Bt.214, Bt.222, Bt.223 e Bt.212 foi identificado como sendo da espécie *D. seriata* (Quadro 11). Para a identificação das espécies, a comparação das sequências obtidas teve de ter 98%, ou mais, de similaridade com as sequências da pesquisa BLAST. A identificação das espécies assim conseguida foi concordante com os grupos obtidos aquando a análise de microssatélites (tipagem) realizada inicialmente.



**Figura 6.** Dendrograma obtido na tipagem do DNA dos isolados *Botryosphaeriaceae* em estudo (o isolado Bt.207 não está presente no dendrograma porque não foi ampliado).

**Quadro 11.** Lista dos isolados em estudo e respetiva espécie.

ISOLADO	ESPÉCIE	ISOLADO	ESPÉCIE
BT.201	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.216	<i>Neofusicoccum parvum</i>
BT.202	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.217	<i>Neofusicoccum parvum</i>
BT.203	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.218	<i>Diplodia mutila</i>
BT.204	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.219	<i>Neofusicoccum parvum</i>
BT.205	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Bt.220	<i>Diplodia seriata</i>
BT.206	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.221	<i>Diplodia seriata</i>
BT.207	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.222	<i>Diplodia seriata</i>
BT.208	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.223	<i>Diplodia seriata</i>
BT.209	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.102	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.210	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.103	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.211	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Bt.105	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.212	<i>Diplodia seriata</i>	Bt.106	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.213	<i>Diplodia seriata</i>	V3	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.214	<i>Diplodia seriata</i>	V15	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BT.215	<i>Diplodia seriata</i>	CBS	<i>Lasiodiplodia mediterranea</i>

Como é possível verificar no Quadro 11, os isolados obtidos do campo (Bt.201 a Bt.223) foram todos identificados como pertencendo ao género *Diplodia* ou à espécie *Neofusicoccum parvum*. A patogenicidade destes isolados já havia sido avaliada (dados não mostrados) pelo que, os testes de patogenicidade e de fungicidas foram apenas realizados para o género *Lasiodiplodia* spp (isolados Bt. 102, Bt. 103, Bt. 105, Bt.106, V3, V15 e CBS do Quadro 11).

#### 5.4. Determinação da agressividade de isolados do género *Lasiodiplodia*

##### *Lesões externas*

Numa primeira fase, cinco semanas após inoculação, foram avaliados o comprimento e largura dos cancrs externos que surgiram nos sarmentos herbáceos de modo a calcular as suas respetivas áreas necrosadas. Posteriormente, quatro meses após inoculação, foi avaliado o comprimento das lesões internas no lenho.

Tanto a área das lesões externas como o comprimento das lesões internas foram submetidos a tratamento estatístico com recurso ao programa R. Inicialmente, foi realizado um teste ANOVA a um fator não se tendo verificado existir homogeneidade de variâncias entre os resultados, não sendo

assim cumpridos os pressupostos necessários a uma ANOVA. Recorreu-se, então, a testes não paramétricos, tendo sido utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que compara os diferentes níveis do fator através de “ranks” de modo a encontrar diferenças significativas entre estes.

Na casta Aragonez, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103 e Bt.105 foram os que causaram lesões externas de maiores dimensões e com reduzida diferença entre eles. O isolado Bt.102 foi o que provocou uma lesão externa maior não tendo uma diferença estatística significativa dos outros isolados Bt. e do isolado CBS. Os isolados V3 e V15 foram os que originaram menores lesões externas. O controlo é significativamente diferente dos restantes isolados com lesões de tamanho muito reduzido e resultantes apenas da cicatrização da ferida realizada nos tecidos herbáceos (Figura 7).

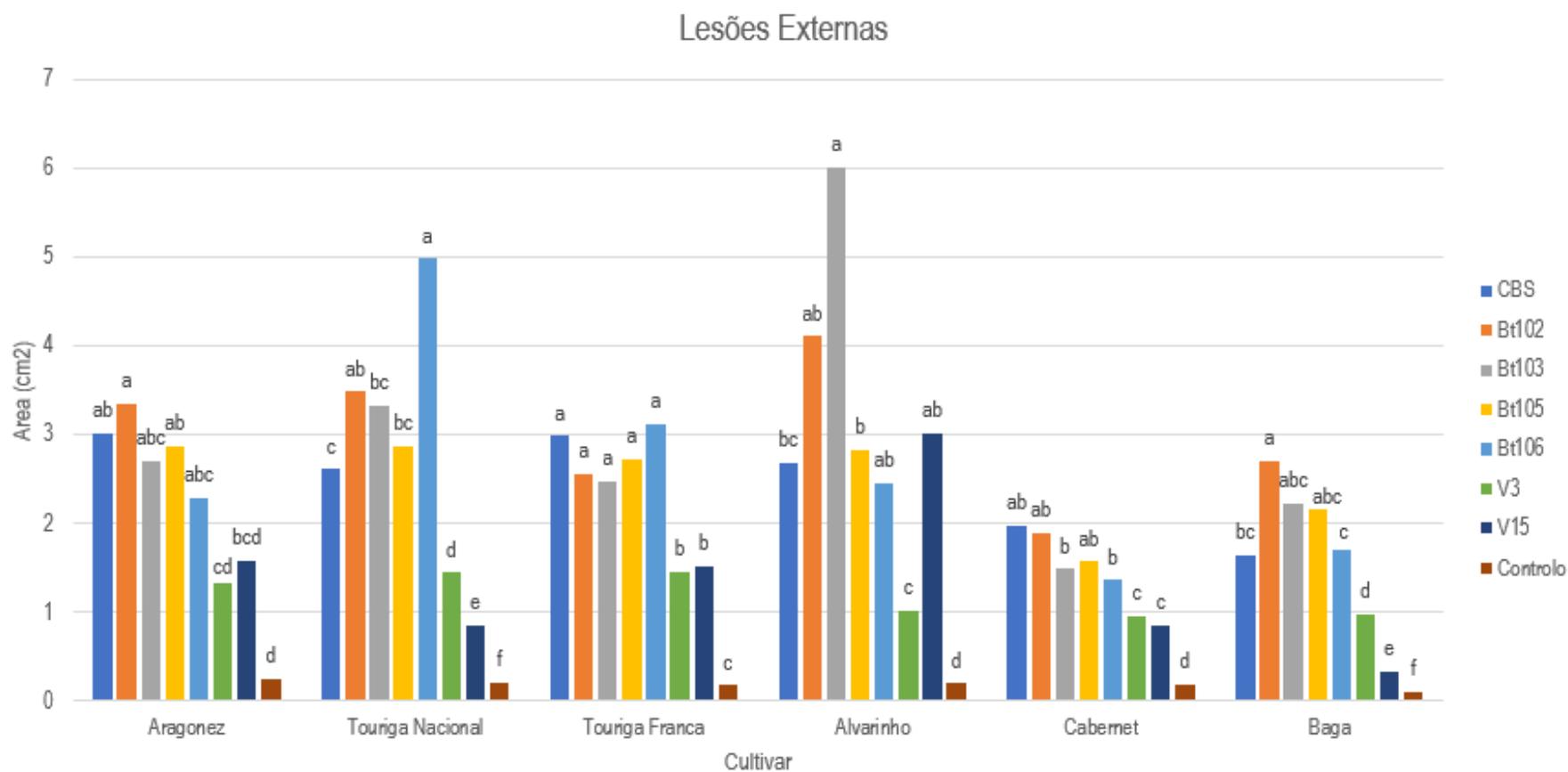
Na casta Touriga Nacional, o isolado Bt.106 foi o que causou lesões externas maiores, seguido do isolado Bt.102. Os isolados CBS, Bt.103 e Bt.105 causaram lesões relativamente menores em relação ao Bt.106, no entanto, não significativamente diferentes entre si. Os isolados V3 e V15 foram os que originaram menores lesões externas, sendo que as lesões do V15 foram significativamente menores do que as causadas pelo isolado V3. O resultado do controlo foi significativamente diferente dos restantes tendo lesões de dimensões muito inferiores (Figura 7).

Na casta Touriga Franca os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 foram os que causam lesões externas maiores e com reduzida diferença entre eles. Os isolados V3 e V15 causam lesões externas significativamente menores e no controlo as lesões são significativamente diferentes dos restantes tendo originado lesões de tamanho muito inferiores e semelhantes nas castas Aragonês e Touriga Nacional (Figura 7).

Na casta Alvarinho, o isolado Bt.103 foi o causou lesões externas maiores. Os isolados CBS, Bt.102, Bt.105, Bt.106 e V15 originaram lesões externas relativamente grandes e com reduzida diferença entre eles. O isolado V3 foi o que provocou menores lesões externas, sendo significativamente diferente dos restantes isolados e o do tratamento controlo cujas lesões apresentaram tamanho muito inferior, tal como acontece nas restantes castas (Figura 7).

Na casta Cabernet Sauvignon, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 foram os que causaram lesões externas maiores e com reduzida diferença entre eles. Os isolados V3 e V15 foram os que causaram menores lesões externas, sendo também semelhantes entre si. No tratamento controlo surgiu uma lesão muito pequena à semelhança do que ocorreu nas outras castas (Figura 7).

Na casta Baga, o isolado Bt.102 foi o que provocou uma lesão maior não sendo, no entanto, significativamente diferente dos isolados Bt.103 e Bt.105 que, não diferem significativamente dos isolados CBS e Bt.106. Os isolados V3 e V15 foram os que originaram menores lesões externas, sendo que as lesões produzidas pelo isolado V15 foram significativamente inferiores às causadas pelo isolado V3. No tratamento controlo a lesão registada era muito reduzida e semelhante aquelas que ocorriam nas outras castas (Figura 7).



**Figura 7.** Área das lesões externas (cm<sup>2</sup>), 5 semanas após inoculação, provocadas pelos isolados CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15 e controlo nas castas Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon e Baga. Para cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis).

### *Lesões internas*

Quanto às lesões internas, também ocorreram diferenças entre isolados dentro da mesma casta. Na casta Aragonez os isolados Bt.102, Bt.103 e Bt.105 foram os que causaram lesões internas maiores embora não tenham sido detetadas diferenças estatísticas significativa entre eles. Os isolados CBS e Bt.106 originaram uma lesão interna significativamente inferior aos anteriores. Os isolados V3 e V15 foram os que causaram menor lesão interna, entre 1,5 e 3 cm e o tratamento controlo foi substancialmente diferente dos restantes tendo lesões de tamanho muito inferior (Figura 8).

Na casta Touriga Nacional, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 foram semelhantes, mas o isolado Bt.106 foi o que causou lesões de maior dimensão, seguido do isolado Bt.103. Os isolados V3 e V15 foram os que produziram menores lesões internas entre 2 e 3cm de comprimento e o tratamento controlo foi significativamente diferente dos restantes tendo provocado lesões de tamanho muito inferior (Figura 8).

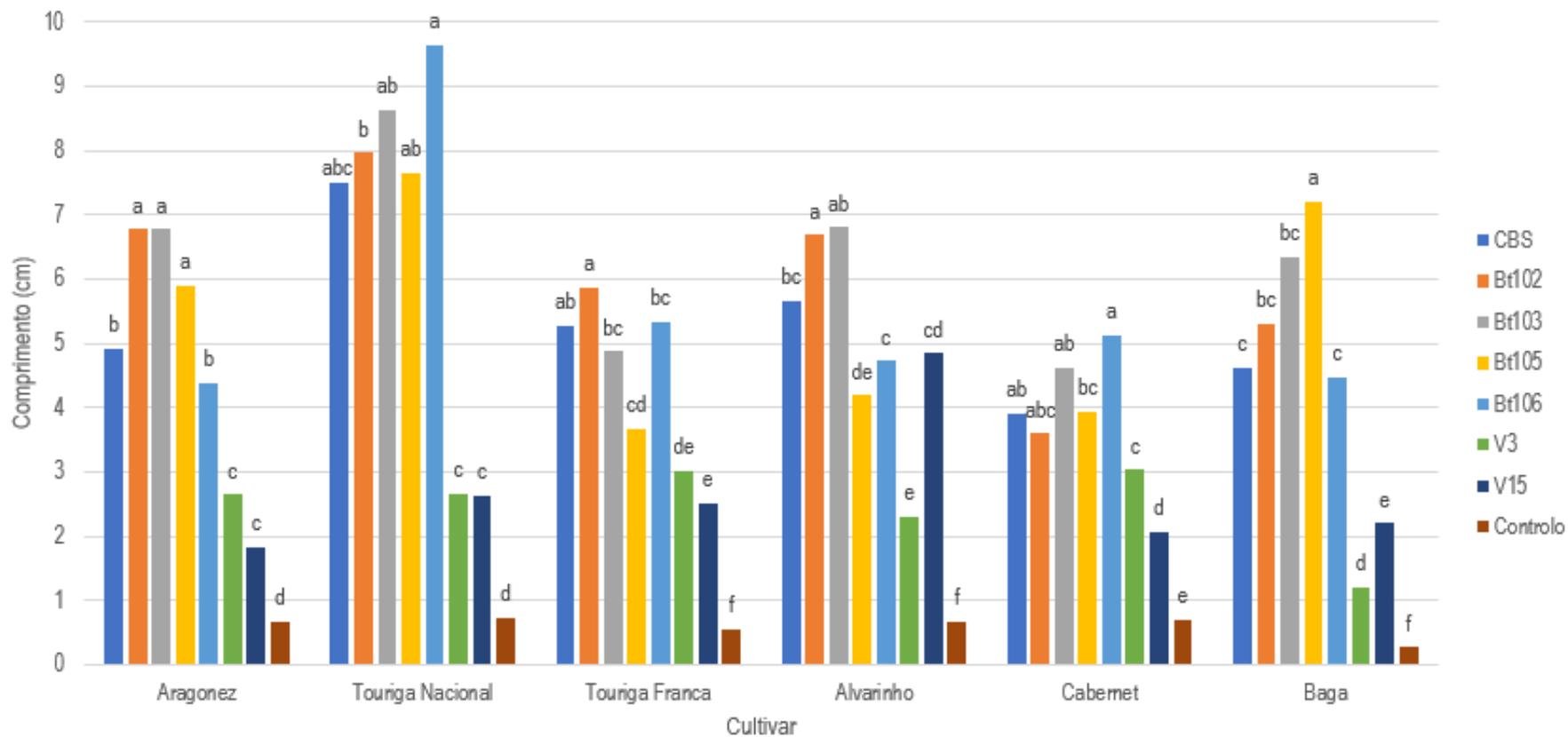
Na casta Touriga Franca, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103 e Bt.106 foram relativamente semelhantes, contudo, o isolado Bt.102 foi o que causou maiores lesões internas. O isolado Bt.105 provocou lesões de menor comprimento, apesar de serem semelhantes às causadas pelos isolados Bt.103 e Bt.106. Os isolados V3 e V15 causaram menores lesões internas, entre os 2 e 3 cm e o tratamento controlo foi significativamente diferente dos restantes isolados tendo lesões de dimensão muito inferior (Figura 8).

Na casta Alvarinho, os isolados Bt.102 e Bt.103 foram os que causam lesões internas de maior extensão e semelhantes entre eles, seguidos dos isolados CBS, BT.106 e V15. O isolado Bt.105 foi significativamente diferente dos outros Bt. O isolado V3 foi o que originou lesões internas menores, entre 2 e 3 cm, e o tratamento controlo é significativamente diferente dos restantes isolados tendo causado lesões de dimensão muito inferior, como seria de esperar (Figura 8).

Na casta Cabernet Sauvignon, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 foram os que causaram lesões internas maiores e foram relativamente semelhantes entre si, contudo, o isolado Bt.106 foi o que provocou maiores lesões, seguido do isolado Bt.103 e do isolado CBS. O isolado V3 provocou lesões maiores do que o isolado V15 e o tratamento controlo, e foi significativamente diferente dos restantes isolados com lesões de tamanho inferior a 1cm (Figura 8).

Na casta Baga, o isolado Bt.105 foi o que provocou maiores lesões internas, seguido dos isolados Bt.103, Bt.102, Bt.106 e CBS, não existindo diferença significativa entre o Bt.106 e o CBS. O isolado V15 provocou lesões com um valor médio acima dos 2 cm e o isolado V3 provocou lesões menores, com um valor médio acima do 1cm. No tratamento controlo, a dimensão média das lesões foi próxima de 0,3cm (Figura 8).

## Lesões Internas



**Figura 8.** Comprimento das lesões internas (cm), 4 meses após inoculação, provocadas pelos isolados (CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15 e controlo) nas castas Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon e Baga. Para cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis).

A casta Aragonez aparentou ser mais suscetível aos isolados Bt.102, Bt.103 e Bt.105 que foram obtidos em Portugal, do que aos isolados V3 e V15 que foram obtidos no Perú (Figura 8). A casta Touriga Nacional, demonstrou ser mais suscetível aos isolados Bt.106, Bt.103, Bt.102 e Bt.105, isolados nacionais (Figura 7). A casta Touriga Franca revelou ser mais suscetível ao Bt.102, Bt.106, CBS e Bt.103, enquanto a casta Alvarinho pareceu ser mais suscetível aos isolados Bt.103, Bt.102 e CBS. A casta Cabernet Sauvignon tem uma maior suscetibilidade aos isolados Bt.106 e Bt.103, enquanto a casta Baga mostrou ter maior suscetibilidade aos isolados Bt.105, Bt.103 e Bt.102 (Figura 8).

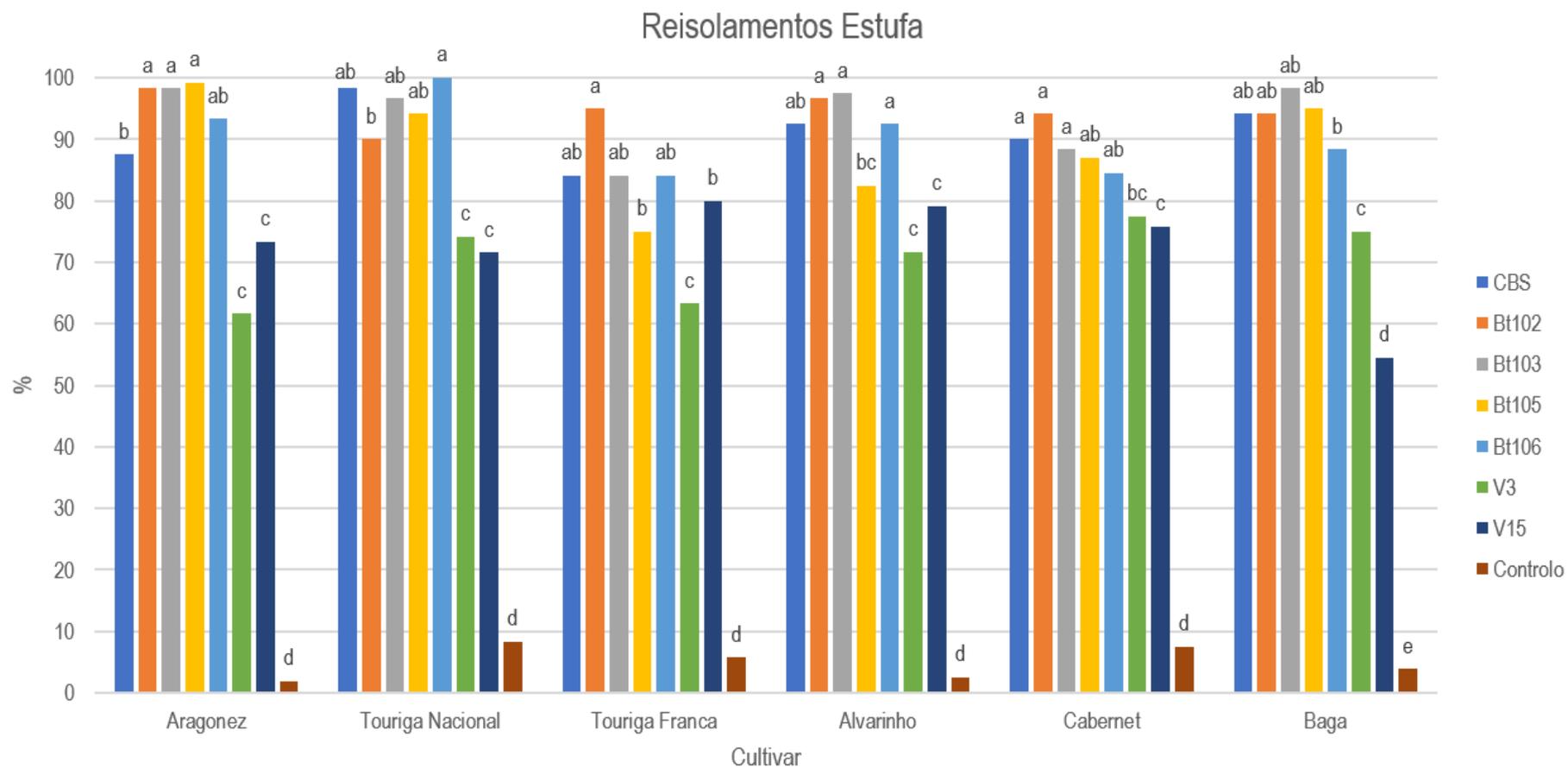
Na Figura 9, é possível observar as percentagens de reisolamento dos isolados em cada casta. É possível observar que tanto para o isolado CBS como os restantes Bt, as percentagens de reisolamento foram relativamente elevadas, entre 75 e 90%; os reisolamentos dos isolados do Peru, o V3 e o V15, tiveram percentagens reisolamentos menores entre 55 e 75%.

Ocorreram diferenças na percentagem de reisolamento dos isolados para cada casta e, todos os isolados inoculados diferiram significativamente do controlo (Figura 9).

Nas castas Aragonez, Touriga Nacional, Alvarinho, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 não diferiram entre si, mas diferiram significativamente dos isolados V3 e V15. Estes últimos, por sua vez não diferiram entre si (Figura 9).

Na casta Touriga Franca e na casta Cabernet Sauvignon apenas o isolado V3 diferiu significativamente dos restantes isolados (Figura 9).

Na casta Baga, os isolados CBS, Bt.102, Bt.103, Bt.105 e Bt.106 não diferiram entre si, mas diferiram significativamente dos isolados V3 e V15. Estes últimos, por sua vez, também diferiram entre si (Figura 9).



**Figura 9.** Percentagem de reisolamentos de cada isolado (CBS, Bt102, Bt103, Bt105, Bt106, V3, V15, controlo) obtidas a partir dos sarmentos inoculados das castas, Aragonez, Touriga Nacional, Touriga Franca, Alvarinho, Cabernet Sauvignon. Em cada casta, os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis).

### 5.5. Ensaio de Fungicidas

Na Figura 10 apresentam-se os resultados das percentagens de reisolamentos obtidos a partir de cada combinação tratamento *versus* isolado para a casta Cabernet Sauvignon.

Nos tratamentos em que foi aplicado o Esquive® extreme (**1, 2, 3 e 4**) foi possível verificar que para os tratamentos 1 e 3, a percentagem de reisolamento foi relativamente mais baixa, 12% e 33%, respetivamente e não diferiram estatisticamente entre si. A percentagem de reisolamento para os tratamentos 2 e 4 não diferiu significativamente entre si e foi mais alta (57% e 58,5%) mas diferiu dos tratamentos 1 e 3.

Nos tratamentos **5, 6, 7 e 8** foi aplicado Esquive® (*Trichoderma atroviride* strain I-1237) juntamente com o CA3356 (nanopartículas de cobre). Os resultados apurados permitem observar uma maior eficácia dos dois produtos aplicados em conjunto, comparativamente à aplicação de Esquive extreme. Os tratamentos 5 e 8 foram aqueles em que se obteve uma percentagem de reisolamento menor, entre os 10,5% e os 16,5% e não diferindo significativamente entre si. Os tratamentos 6 e 7 foram os que apresentaram maior percentagem de reisolamento, entre 39 e 50%, não sendo estatisticamente diferentes, no entanto as suas percentagens de reisolamento foram significativamente superiores às percentagens dos tratamentos 5 e 8, o que revelou uma menor eficácia do tratamento para os isolados Bt.105 e V3 e uma maior eficácia para o isolado CBS.

Comparando os resultados obtidos nos tratamentos 1, 2, 3 e 4 com os obtidos com os tratamentos 5, 6, 7 e 8, foi possível registar que os resultados dos reisolamentos relativos aos tratamentos: 1, 2 e 4 foram superiores aos resultados dos isolados 5, 6 e 8 respetivamente, como seria de esperar. No entanto, o isolado V3 (tratamento 3) teve uma percentagem média de reisolamento superior quando usado o Esquive® com o CA3356, do que apenas usando o Esquive®.

Nos tratamentos **9, 10, 11 e 12** foi aplicado apenas o Tessior® houve uma redução de eficácia quando apenas se usa apenas este produto em relação ao seu uso em conjunto com o CA3356. Esta diferença foi mais notória no controlo (tratamento 9) e no BT.105 (tratamento 10) havendo uma percentagem de reisolamento mais baixa quando foi utilizado o Tessior® com o CA3356 do que quando foi utilizado o Tessior® extreme. O isolado CBS não teve praticamente diferença na percentagem média de reisolamento entre os tratamentos com CA3356 (tratamento 12) e sem CA3356 (tratamento 8). Por outro lado, o isolado V3 (tratamento 11) teve uma percentagem média de reisolamento inferior á percentagem média de reisolamento do tratamento no qual foi utilizado o Tessior® com o CA3356 (tratamento 15).

Nos tratamentos **13, 14, 15 e 16** foi aplicado Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero) juntamente com o CA3356 (nanopartículas de cobre) e foram inoculados os isolados Bt.105, V3 e CBS além do controlo que foi inoculado com água. Neste caso volta a verificar-se um certo aumento de

eficácia quando os dois produtos foram aplicados em conjunto comparativamente à aplicação somente de Tessior. Todos os tratamentos apresentaram percentagens de reisolamento relativamente baixas, entre 13% e 21%, não havendo diferença significativa entre eles. No entanto, houve uma maior eficácia para os isolados BT.105 e CBS do que para o controlo e para o isolado V3.

Por fim, nos tratamentos **17, 18 e 19** não foram aplicados produtos fungicidas (controlo) e tal como nos outros tratamentos, foram inoculados com os isolados Bt.105, V3 e CBS. Os resultados obtidos relativos às percentagens de reisolamentos foram relativamente semelhantes, variando entre 46,5% e 61,5% e não havendo entre eles diferenças significativas. Foi ainda possível observar que as percentagens de reisolamento destes três isolados é superior à que se obteve para os tratamentos com produtos fungicidas aplicados, o que demonstra a eficácia dos produtos testados.

Na Figura 11 apresentam-se os resultados das percentagens de reisolamentos obtidos de cada combinação tratamento *versus* isolado para a casta Touriga Nacional.

Nos tratamentos **1, 2, 3 e 4** foi aplicado Esquive® extreme (*Trichoderma atroviride* I-1237) e, como é possível observar na figura 11, há semelhança estatística entre os tratamentos, variando as suas percentagens médias entre 31,5% e 43,5%.

Nos tratamentos **5, 6, 7 e 8** foi aplicado Esquive® (*Trichoderma atroviride*) juntamente com o CA3356 (nanopartículas de cobre) e foram inoculados os isolados Bt.105, V3 e CBS além do controlo que foi inoculado com água. Como é possível observar na figura 11, há semelhança estatística de percentagens entre estes quatro tratamentos, variando entre os 46,5% e os 58,5%. Ao comparar estes tratamentos com os tratamentos controlo, tratamentos 17, 18 e 19, é possível observar uma diminuição de percentagem de reisolamentos quando aplicados os produtos para os tratamentos 6 e 8 indicando alguma eficácia por parte da combinação dos dois produtos. No entanto, o tratamento 7 teve um valor de percentagem média próximo do valor de percentagem média do tratamento 18.

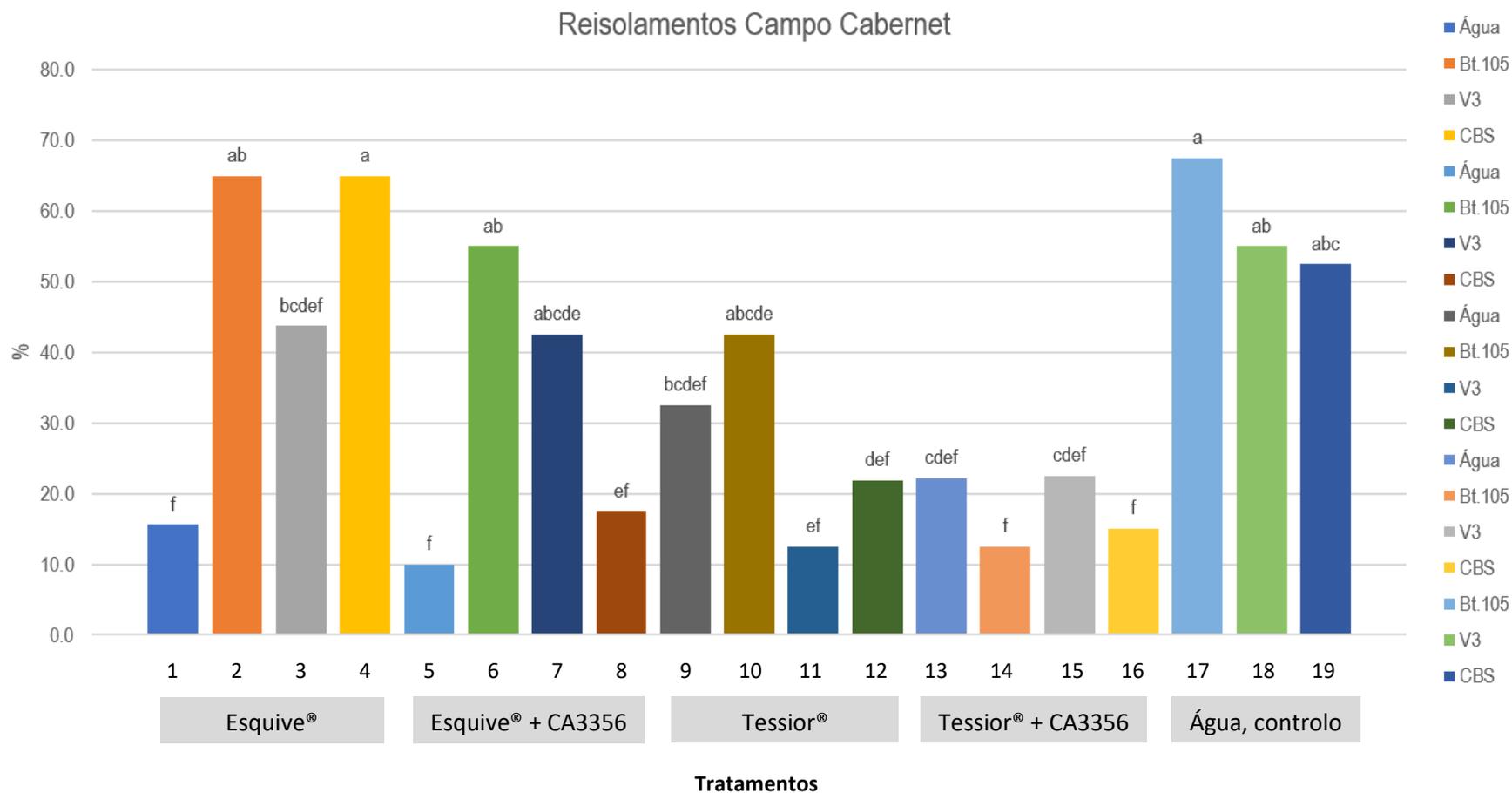
Comparando os tratamentos 1, 2, 3 e 4 (Esquive®) com os tratamentos 5, 6, 7 e 8 (Esquive® com CA3356), é visível uma diminuição das percentagens médias de reisolamento, sendo estas mesmas inferiores para os tratamentos que utilizaram apenas Esquive® em relação aos tratamentos que utilizaram Esquive® em conjunto com o CA3356, mostrando uma maior eficácia do Esquive® quando utilizado extreme. Comparando estes tratamentos com os tratamentos controlo, tratamentos 17, 18 e 19, houve diminuição da percentagem média de reisolamento quando utilizado apenas o Esquive® em relação à não utilização de produtos, o que significa que o *Trichoderma atroviride* strain I-1237 é eficaz no controlo.

Nos tratamentos **9, 10, 11 e 12** foi aplicado apenas o Tessior® (boscalide + piraclostrobina+ polímero). Sendo, mais uma vez possível observar na figura 11, há semelhança estatística entre estes tratamentos, variando as suas percentagens de reisolamento entre os 43,5% e os 54%.

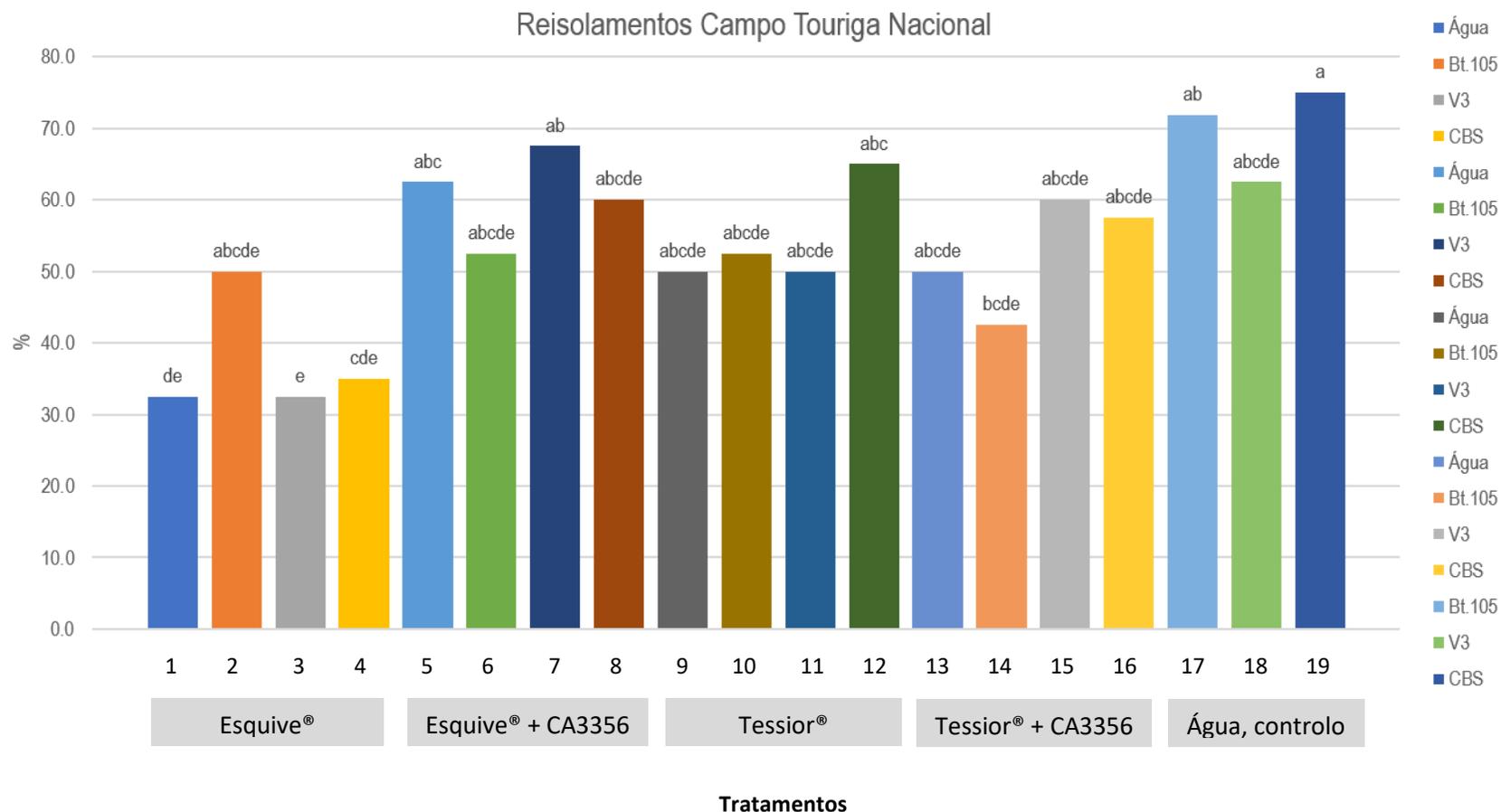
Nos tratamentos **13, 14, 15 e 16** foi aplicado Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero) juntamente com o CA3356 (nanopartículas de cobre). Os resultados apresentados na figura 11 mostram que, há semelhança estatística entre estes tratamentos com variação de percentagens médias entre os 39% e os 55,5%. Comparando estes tratamentos com os tratamentos controlo, tratamentos 17, 18 e 19, é possível dizer que houve alguma eficácia contra os isolados Bt.105 e CBS, uma vez que houve diminuição na percentagem de reisolamento. No entanto, o mesmo não se pode dizer em relação ao isolado V3 que tanto no tratamento 15 como no tratamento 18 foi obtida a mesma percentagem média de reisolamento de 55,5%.

Os tratamentos 9, 10 e 12 obtiveram valores médios de reisolamentos superiores às dos tratamentos 13, 14 e 16 respetivamente. No entanto, o tratamento 11 no qual foi apenas utilizado o Tessior®, teve uma menor percentagem de reisolamento do que o tratamento 15 no qual foi utilizado o Tessior® em combinação com o CA3356. Comparando ainda estes tratamentos com os tratamentos controlo, tratamentos 17, 18 e 19, houve uma diminuição nas percentagens médias de reisolamentos em ambos os tratamentos.

Por fim, nos tratamentos **17, 18 e 19** não foram aplicados produto fungicidas (controlo). Os resultados obtidos relativos às percentagens de reisolamento foram semelhantes, variando entre 55,5% e 66,7% e não havendo diferença estatística significativa entre eles. Além disso, é possível observar na figura 11 que as percentagens destes foram superiores às percentagens obtidas nos tratamentos com produtos fungicidas o que demonstra a existência de eficácia dos produtos testados contra os isolados em estudo.



**Figura 10.** Percentagens de reisolamentos dos isolados inoculados na vinha do Almotivo (ISA) de acordo com cada combinação tratamento - isolado realizado para a casta Cabernet. Tratamentos 1 - 4: Esquive® (*Trichoderma atroviride*); Tratamentos 5 – 8: Esquive® (*Trichoderma atroviride*-I 1237) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 9 – 12: Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero); Tratamentos 13 – 16: Tessior® (boscalide + piraclostrobina+ polímero) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 17 – 19: sem produto aplicado. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 11.** Percentagens de reisolamentos dos isolados inoculados na vinha do Almotivo (ISA) de acordo com cada combinação tratamento - isolado realizado para a casta Touriga Nacional. Tratamentos 1 - 4: Esquive® (*Trichoderma atroviride*-I 1237); Tratamentos 5 – 8: Esquive® (*Trichoderma atroviride*) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 9 – 12: Tessior® (boscalide + piraclostrobina + polímero); Tratamentos 13 – 16: Tessior® (boscalide + piraclostrobina+ polímero) + CA3356 (nanopartículas de cobre); Tratamentos 17 – 19: sem produto aplicado. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Kruskal-Wallis).

## 6. Discussão

Através da caracterização molecular e morfológica dos isolados obtidos em campo, foi possível identificar três espécies de *Botryosphaeriaceae*, sendo estas *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* e *Diplodia mutila*. A espécie mais comum identificada foi *Diplodia seriata*, representando 74% do total de isolados identificados. Esta informação, está de acordo com outros estudos tais como Auger *et al.* (2004) no Chile, Luque *et al.* (2009) em Espanha e Carlucci *et al.* (2015), que identificaram esta espécie como sendo uma das espécies mais comuns associadas a botriosferiose não só nos países referidos mas a nível mundial (Úrbez-Torres *et al.*, 2008).

É sabido que a agressividade difere entre espécies e entre isolados de uma mesma espécie (Úrbez-Torres & Gubler, 2009). A espécie *Lasiodiplodia theobromae* foi classificada como a mais agressiva das espécies da família *Botryosphaeriaceae*, seguida da espécie *Neofusicoccum parvum* e foi confirmada a agressividade das restantes espécies associadas à botriosferiose (Úrbez-Torres, 2011). Foram identificadas três categorias de agressividade: as altamente agressivas, de entre as quais estão as espécies *Lasiodiplodia theobromae* e *Neofusicoccum parvum*, as moderadamente agressivas, de entre as quais estão as espécies de *Diplodia* spp. e as ligeiramente agressivas (Úrbez-Torres, 2011). Assim sendo, neste trabalho optou-se por fazer testes de patogenicidade e de fungicidas para a espécie *Lasiodiplodia theobromae* por ser a espécie menos estudada e também por revelar elevado potencial para se tornar problemática em Portugal.

Analisando as dimensões das lesões externas e das lesões internas obtidas nos ensaios de patogenicidade executados em estufa verificou-se que era notória a diferença no tamanho das lesões provocadas pelos isolados vindos do Peru e pelos isolados nacionais. De um modo geral, os isolados do Peru provocam lesões externas e internas significativamente menores que os isolados obtidos em Portugal e que o isolado do CBS.

Apurou-se alguma concordância entre os resultados obtidos para as lesões externas e internas causadas por isolados de *Lasiodiplodia* sp., contudo a cast que apresentou maiores lesões externas foi o Alvarinho enquanto que a casta Touriga Nacional apresentou maiores lesões internas, o que permite sugerir que foi a mais suscetível, seguida das castas Alvarinho, Aragonez, Touriga Franca, Baga e Cabernet Sauvignon. Relativamente aos isolados do Peru, a casta que aparenta ter maior suscetibilidade para o isolado V15 é a casta Alvarinho e para o isolado V3 é a casta Cabernet Sauvignon. Além disso, o facto de a casta Alvarinho ser a casta que revelou maiores lesões externas e internas provocadas pelo isolado V15, quando as restantes castas têm lesões bastante inferiores pode sugerir que o parâmetro casta, poderá ter um importante papel na progressão desta espécie. Esta informação está em concordância com diversos estudos efetuados anteriormente, nos quais diferentes castas demonstraram diferentes suscetibilidades relativamente a diferentes espécies do género

Botryosphaeriaceae. Ramírez *et al.* (2018) mostrou que existiam diferenças de suscetibilidade entre isolados de *D. mutila* e *D. seriata*, entre as castas Cabernet Franca, Malbec, Merlot e Sauvignon Blanc. Esta diferença de susceptibilidade entre castas pode estar relacionada com dimensão dos vasos condutores da planta, como foi previamente estabelecido para a esca nas castas Merlot e Cabernet Sauvignon (Pouzolet *et al.*, 2014). A aparente relação entre a dimensão dos vasos e a suscetibilidade à esca e a outros fungos causadores de doenças do lenho pode explicar as diferenças observadas na suscetibilidade das seis castas em estudo a *L. theobromae* e *L. mediterranea*.

Analisando os resultados para as lesões na mesma casta, existe uma certa consistência para os diferentes isolados nacionais e os obtidos no Peru. Os isolados obtidos em Portugal provocaram lesões internas e externas maiores que os isolados do Peru. Esta diferença de agressividade ocorre igualmente nos resultados obtidos para a percentagem de reisolamento dos isolados. Esta percentagem foi inferior para os isolados provenientes do Peru que foram significativamente inferiores às percentagens de reisolamentos obtidas para os isolados nacionais e para o isolado do CBS. Esta variação significativa em agressividade já foi previamente observada em múltiplas espécies de Botryosphaeriaceae. Por exemplo, Savocchia *et al.* (2007) encontrou diferenças significativas no comprimento de lesões causadas por isolados de *D. seriata* e *N. luteum*, tanto em sarmentos, como em videiras envasadas e mantidas em estufa. Em 2004, van Nierkerk *et al.* também verificou que alguns isolados de *D. seriata* e *N. australe* produziam lesões, em videira, duas vezes superiores aos restantes isolados em estudo. Mais recentemente, esta diferença de agressividade entre isolados foi reportada por Reis *et al.* (2016), entre isolados de *N. parvum* e *D. seriata*, em videiras com um ano de crescimento. No presente estudo, esta variabilidade de agressividade entre isolados portugueses, isolados peruanos e o isolado de referência do CBS está também de acordo com o estudo efetuado por Úrbez-Torres & Gubler (2009), no qual se verificou que a variabilidade de agressividade entre isolados de espécies de Botryosphaeriaceae depende do tipo de tecido inoculado bem como da origem geográfica do isolado, período de incubação, tipo de inóculo utilizado, idade do hospedeiro, e por fim a suscetibilidade da casta.

A poda das videiras é uma prática essencial em viticultura, realizada durante o período de repouso vegetativo das plantas. No entanto, as feridas de poda causadas por esta prática, são consideradas como sendo um dos principais locais de infeção de fungos responsáveis por doenças do lenho da videira, nas quais se inclui a botriosferiose. Desta forma, uma das formas de mitigar estas infeções, será uma eficaz protecção das feridas de poda. Nas figuras 10 e 11 apresentam-se os resultados para a percentagem de reisolamentos obtidos de cada combinação tratamento x isolado no ensaio realizado na vinha do Almotivo (ISA) na casta Cabernet e Touriga Nacional respetivamente. De um modo geral, é possível verificar que as percentagens de reisolamento foram maiores para a casta Touriga Nacional do que para a casta Cabernet Sauvignon. Apesar do ensaio de fungicidas ter sido efetuado numa vinha

com 20 anos, não sendo por isso de descartar possíveis infecções naturais prévias, bem como diferentes condições fisiológicas provenientes de stresses bióticos e abióticos ocorridos em anos anteriores que possam contribuir de alguma forma para um comportamento diferente entre as duas castas, este resultado está em concordância com os resultados encontrados para os ensaios de patogenicidade, nos quais a casta Touriga Nacional aparenta ter uma maior suscetibilidade a *Lasiodiplodia* sp. do que a casta Cabernet Sauvignon, que apresentou em média, maiores valores de lesões internas e externas, além de percentagens de reisolamento também maiores.

As percentagens de reisolamentos obtidos a partir da casta Cabernet Sauvignon foram superiores nos tratamentos com Esquive® do que nos tratamentos com Tessior®, sugerindo uma maior eficácia momentânea do Tessior® ao invés do Esquive®, visto o primeiro ter na sua composição um polímero de cola selante e a mistura de dois fungicidas e o segundo ser um fungo colonizador que atua mais lentamente como antagonista dos fungos causadores da botriosferiose. Por sua vez, os resultados das percentagens de reisolamentos provenientes da casta Touriga Nacional apresentam percentagens muito semelhantes entre os tratamentos com Esquive® e os tratamentos com Tessior® neste caso, existindo mesmo uma aparente maior redução no caso do uso do Esquive®. O Tessior® é um produto que devido ao seu componente selante deveria em teoria conferir um efeito imediato de proteção das feridas de poda, em comparação com o Esquive® que necessitará de tempo para colonizar as feridas, podendo estas manterem-se suscetíveis à infecção por um período de tempo mais prolongado. A diferença de resultados entre as duas castas poderá ser devida não só à diferença de suscetibilidade entre as duas castas ao patógeno, mas também à capacidade de colonização das feridas de poda por parte de *Trichoderma* sp., a qual já foi reportada anteriormente por Mutawila *et al.* (2016) e que pode ser influenciada pelas diferenças entre castas. Estas diferenças poderão ser resultantes do estado fisiológico das plantas aquando a poda, que irá determinar a resposta da videira ao crescimento do agente de biocontrolo. Esta variação entre castas pode também ser explicada por diferentes propriedades intrínsecas da madeira, tal como disponibilidade de nutrientes e pH (Bates *et al.*, 2002; Weyand & Schultz, 2006; Holzapfel *et al.*, 2010), e pelos próprios mecanismos de defesa das videiras que variam entre cada casta.

Para os tratamentos efetuados em Cabernet Sauvignon, com aplicação de Esquive® extreme, obteve-se maior percentagem de reisolamento do que nos tratamentos nos quais houve conjugação do Esquive® com o CA3356 (um fungicida à base de nanopartículas de cobre) apesar de não se verificarem grandes diferenças estatísticas entre os dois tratamentos com exceção do resultado obtido para o isolado V3. Nos tratamentos realizados em Touriga Nacional em que houve o uso do Esquive® extreme houve uma menor percentagem de reisolamento do que nos tratamentos nos quais houve conjugação do Esquive® com o CA3356. O produto CA3356 é uma formulação de cobre distribuído sistemicamente na planta por nanopartículas de hidroxiapatita, reduzindo assim o impacto do cobre no meio ambiente,

pois é aplicado em doses muito inferiores, sendo mais eficaz e persistente na planta (Battiston, 2018). Esta diferença de resultados para as duas castas em estudo, pode sugerir um efeito negativo do fungicida sobre *Trichoderma* sp., isto é, poderá existir uma suscetibilidade de *Trichoderma* a esta formulação. Este efeito é mais aparente para a casta Touriga Nacional do que para a casta Cabernet Sauvignon. Tal, pode dever-se a uma melhor colonização por parte do *Trichoderma* sp. presente no Esquive® na Touriga Nacional, tendo por isso uma maior eficácia quando aplicado extreme. Esta possível incompatibilidade poderá vir de um efeito fungicida ou fungistático por parte do CA3356 sobre a estirpe de *Trichoderma* sp. presente no Esquive® que deverá ser esclarecida, não só com a repetição do ensaio de campo, mas também com ensaios de inibição de crescimento micelial *in vitro*.

Nos tratamentos em que se aplicou o Tessior® extreme, na casta Cabernet Sauvignon obteve-se maior percentagem de reisolamento do que nos tratamentos nos quais houve conjugação do Tessior® com o CA3356, sugerindo maior eficácia da conjugação em relação ao uso do Tessior® extreme. No caso da Touriga nacional, nos tratamentos em que houve o uso do Tessior® extreme, a percentagem de reisolamento foi bastante semelhante à percentagem obtida nos tratamentos nos quais houve conjugação do Tessior® com o CA3356, não havendo diferença significativa de eficácia da conjugação do Tessior® com o CA3366 em relação ao uso do Tessior® extreme. Neste caso, existe uma aparente diferença de eficácia tanto da aplicação destes dois produtos extremes, como em combinação. Este efeito pode, como foi referido, ser devido a uma diferença de suscetibilidade das castas em estudo, mas necessita de uma investigação mais profunda, com a repetição do ensaio, de forma a obter um conjunto de dados mais robusto e verificar se esta tendência de comportamento se mantém para estas combinações tratamento/fungo.

Por fim, neste trabalho é de realçar a possível existência do fator casta na eficácia dos produtos perante os isolados, uma vez que a casta Touriga Nacional já tinha demonstrado uma maior suscetibilidade a *Lasiodiplodia* sp. do que a Cabernet Sauvignon. Este resultado está em conformidade com as percentagens de reisolamento obtidas a partir dos controlos positivos efetuados no campo as quais são maiores para a casta Touriga Nacional do que as percentagens obtidas a partir da casta Cabernet Sauvignon.

## 7. Conclusão

Devido à importância crescente existente com as doenças do lenho da videira, era o objetivo deste trabalho proceder à identificação de isolados recolhidos na região centro e sul do País em 2018 e associados à botriosferiose. Realizou-se um ensaio em estufa com o objetivo de avaliar a agressividade de um conjunto de isolados selecionados de *Lasiodiplodia* e a suscetibilidade de um conjunto de castas de videira. Avaliou-se ainda a eficácia de três produtos fungicidas num ensaio de campo.

A espécie mais frequentemente identificada foi *Diplodia seriata*, representando 74% do total de isolados identificados. A caracterização cultural permitiu concluir que os isolados em estudo, embora da mesma família, eram bastante diferentes entre si; a caracterização morfológica agrupou o isolados em dois grupos: um grupo com esporos ovoides e corados e um grupo com esporos fusiformes e hialinos. A caracterização molecular confirmou a existência de dois grandes grupos e um grupo de apenas com um isolado. Os isolados agrupados foram identificados como pertencentes à espécie *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* e o isolado Bt.218 foi identificado como pertencente à espécie *Diplodia mutila*.

Os isolados do Peru provocam lesões externas e internas significativamente menores que os isolados obtidos em Portugal e que o isolados do CBS. A cata Alvarinho foi a que apresentou maiores lesões externas para todos os isolados em estudos sendo por isso a mais suscetível das castas.

No ensaio de fungicidas foi possível observar que os tratamentos realizados com combinação de fungicidas (Tessior® + CA3356 e Esquive®+ CA3356) foram mais eficazes do que os tratamentos com os produtos extremes. Na casta Touriga Nacional, o produto que demonstrou maior eficácia foi o Esquive enquanto que no Cabernet Sauvignon foi a combinação Tessior+CA3356

## 8. Referências Bibliográficas

- Agustí-Brisach, C., and Armengol, J.** 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathol. Mediterr.* **52**: 245-261.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. L.** 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* **28**: 1-13.
- Alves A, Phillips AJ, Henriques I, Correia A.** 2007. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* **158**: 112–121.
- Amponsah, N. T., Jones, E. E., Ridgway, H. J., & Jaspers, M. V.** 2009. Rainwater dispersal of *Botryosphaeria* conidia from infected grapevines. *N. Z. Plant Prot.* **62**: 228-233.
- Aroca A., R. Raposo, D. Gramaje, J. Armengol, S. Martos and J. Luque, 2008.** First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with decline of grapevine rootstock mother plants in Spain. *Plant Disease* **92**: 832.
- Auger, J., Esterio M., Ricke G. and Pérez, I.** 2004. Black dead arm and basal canker on *Vitis vinifera* cv. Red globe caused by *Botryosphaeria obtuse* in Chile. *Plant disease* **88**: 1286.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M. V., Jones, E. E., & Ridgway, H. J.** 2013. Development of isolate-specific markers for *Neofusicoccum parvum* and *N. luteum* and their use to study rainwater splash dispersal in the vineyard. *Plant Pathol.* **62**: 501 - 509.
- Battiston, E.** 2018. Developing an innovative tool to enhance the biological activity of active substances for the control of fungal diseases in *Vitis vinifera* L. PhD thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, França.
- Bates, T., Dunst, R. and Joy, P.** 2002. Seasonal dry matter, starch, and nutrient distribution in 'Concord' grapevine roots. *HortScience* **37**: 313-316.
- Bertsch C, Larignon P, Farine S, Clément C, Fontaine F.** 2009. The spread of grapevine trunk disease. *Science* **324**:721.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., et al.** 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* **62**: 243-265.
- Billones-Baaijens, R., Jaspers, M., Allard, A., Hong, Y., Ridgway, H., and Jones, E.** 2015. Management of Botryosphaeriaceae species infection in grapevine propagation materials. *Phytopathol. Mediterr.* **54**: 355-367.
- Burruano S., V. Mondello, G. Conigliaro, A. Alfonso, A. Spagnolo and L. Mugnai.** 2008. Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea* **47**: 132–136.
- Carlucci, A., Cibelli, F., Lops, F., Raimondo, M. L.** 2015. Characterization of *Botryosphaeriaceae* species as casual agents of trunk diseases on grapevines. *Plant Dis.* **99**: 1678-1688.
- Carter, M. V.** 1957a. *Eutypa armeniaca* Hansf. and Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in Southern Australia. *Aust. J. Bot.* **5**: 21-35.

- Carter, M. V.** 1957b. Vines aid spread of apricot “gummosis”. *J. Dep. Agric. S. Aust.* **60**: 482-483.
- Cooper, M., Klonsky, K. M., and De Moura, R. L.** 2012. Sample cost to establish a vineyard and produce winegrapes (Cabernet Sauvignon) in the North Coast Region (Napa County). *University of California Cooperative Extension*.
- Costa, J. N. G.** 2018. *Evaluations of chemicals against esca-related pathogenes, in vitro as a pruning wound protectants*. MSc thesis. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, Portugal
- Crocker, J., Waite, H., Wright, P., and Fletcher, G.** 2002. Source area management: avoiding cutting dehydration and good nursery management may be the keys to successful hot water treatment. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker* **461**: 33-37.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J. Z.** 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* **55**: 235-253
- Crous, P. W.** 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, **76**, 51-16.
- Decreto-Lei 180/95 de 26 de julho (1995) – Regime jurídico de base relativos aos métodos de proteção das culturas, em especial a luta química aconselhada, a proteção integrada e a produção integrada
- Decreto-Lei 180/95 de 26 de julho (1995)** – Regime jurídico de base relativos aos métodos de proteção das culturas, em especial a luta química aconselhada, a proteção integrada e a produção integrada.
- Decoin, M.** 2001. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma* **543**: 28-33.
- EFSA Panel on Plant Health.** 2015. Scientific opinion on hot water treatment of *Vitis* sp. for *Xylella fastidiosa*. *EFSA J.* **13**: 4225.
- Elena, G., and Luque, J.** 2016. Pruning debris of grapevine as a potential inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of Botryosphaeria dieback. *Eur. J. Plant Pathol.* **144**: 803-810.
- Epstein, L., Sukhwinder, K., and VanderGheynst, J. S.** 2008. Botryosphaeria-related dieback and control investigated in non-coastal California grapevines. *Calif. Agric.* **62**: 161-166.
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C., Corio-Costet, M. F.** 2016. Grapevine Trunk Disease: A Review. **1°Ed.** Paris, França: OIV Publications.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., and Armengol, J.** 2010. Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Ann. Appl. Biol.* **156**: 231-241.
- Gramaje D, Armengol J.** 2011. Fungal trunk pathogenes in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant disease* **95**: 1040-1055.
- Gramaje, D., and Di Marco, S.** 2015. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathol. Mediterr* **54**:313-324.

- Gramaje, D., Mañas, F., Lerma, M. L., Muñoz, R. M., García-Jiménez, J., and Armengol, J.** 2014. Effect of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and composition of must. *Aust. J. Grape Wine Res.* **20**: 144-148.
- Gramaje D., Úrbez-Torres J.R., Sosnowski M.R.** 2018. Managing Grapevine Trunk Diseases with respect to etiology and epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant disease* **102**: 1, 12–39.
- Gubler, W. D., Rooney-Latham, S., Vasquez, S. J., and Eskalen, A.** 2013. Esca (Black Measles) and Petri disease. In: *Grape Pest Management*. University of California, Agriculture and Natural Resources. Publication 3343.
- Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P., et al.** 2016. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biol. Control* **92**: 55–65.
- Halleen, F., Fourie, P. H., and Crous, P. W.** 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* **45**: S55-S67.
- Halleen, F., & Fourie, P. H.** 2016. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **37**: 104-114.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., and Geneve, R.** 2001. *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*, 7<sup>o</sup> Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D. et al.** 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* **54**: 51.
- Holzappel, B. P., Smith, J. P., Field, S. K. and Hardie, W. J.** 2010. Dynamics of carbohydrate reserves in cultivated grapevines. *Horticulture Reviews* **37**: 143-211.
- Hunter, J. J., Volschenk, C. G., Le Roux, D. J., Fouché, G. W., Adams, L.** 2004. *Plant Material Quality*, a compilation of research. Research Reports. ARC Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch, South Africa.
- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., and Fourie, P.** 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol. Mediterr.* **50**: S247-S263.
- Kuntzmann, P., Villaume, S., and Bertsch, C.** 2009. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathol. Mediterr.* **48**: 150-154.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Tégou, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.F., Cluzet, S.** 2012. Phenolics and Their Antifungal Role in Grapevine Wood Decay: Focus on the Botryosphaeriaceae Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 11859–11868.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C.** 2009. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus Biologies* **332**: 765-783.

- Linaldeddu, B. T., Deidda, A., Scanu, B. et al.** 2015. Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. Nov. *Fungal Diversity* **71**: 201-214.
- Luque, J., Matos, S., Aroca, A., Raposo, R. and García-Fihueres, F.** 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *J. Plant Pathol.* **91**: 381-390.
- Liu, J. K., Phookamsak, R., Doilom, M., et al.** 2012. Towards a natural classification of *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Diversity* **57**: 149-210.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J., Smith, L. R., Schoch, T. K., Rolshausen, P. E., and Gubler, W. D.** 2005. Dying-arm disease in grapevines: diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 8148-8155.
- Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., Fontaine F.** 2018. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease* **102**: 1189–1217.
- Mondello V., Spagnolo A., Larignon P., Clément C., Fontaine F.** 2019 Phytoprotection potential of *Fusarium proliferatum* for control of *Botryosphaeria* dieback pathogens in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **58**: 293-306.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., and Williams, L. A.** 1992. Biology of the grapevine. M. G. Mullins, ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Munkvold & Marois.** 1993. The effects of fungicides on *Eutypa lata* germination, growth and infection of grapevines. *Plant Disease* **77**: 50-55.
- Mutawila, C., et al.** 2015. Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl* **60**: 387-399.
- Mutawila, C., Halleen, F., and Mostert, L.** 2016. Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* **22**:279-287.
- Phillips, A. J. L.** 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* **146**: 327–332.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z, Crous, P.W.** 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Stud. Mycol.* **76**, 51-167.
- Pinto C., Custódio V., Nunes M., Songy A., Rabenoelina F., Fontaine F.** 2018. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology* **9**:3047.

- Pouzoulet, J., Pivovarov, A. I., Santiago, L. S. and Rolshausen, P. E.** 2014. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lesson from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1-11.
- Punithalingam E.** 1976. *Botryodiplodia theobromae*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 2 p.
- Ramirez, M., Pérez, L. M. and Montealegre, J.** 2018. Susceptibility of different grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to *Diplodia seriata* and *Diplodia mutila*. *Cien. Inv. Agr.* **45**(1): 93-98.
- Rego, C., et al.** 2005. Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. Abstracts OILB-Meeting Working Group of Integrated Control in Viticulture. Darfo Boario, Italy.
- Rego C, Nascimento T, Pinto P, Oliveira H.** 2010. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with cankers and dieback of grapevine (*Vitis vinifera*) in Portugal.
- Rego, C., Oliveira, H. Sofia, J.** 2012. Doenças do Lenho da videira. In: Manual Bayvitis – a fitossanidade da videira. Ed. Bayer CropScience, II edição, Carnaxide Portugal, 331
- Reis, P., Gaspar, A., Alves, A., Fontaine, F., Lourenço, I., Saramago, J., Mota, M., Rego, C.** 2020. Early Season Symptoms on Stem, Inflorescences and Flowers of Grapevine Associated with *Botryosphaeriaceae* Species. *Plants* **9**: 1427.
- Reis, P., Magnin-Robert, M., Nascimento, T., Spagnolo, A., Abou-Mansour, E., Fioretti, C., Clément, C., Rego, C., and Fontaine, F.** 2016. Reproducing *Botryosphaeria* dieback foliar symptoms in a simple model system. *Plant Dis.* **100**: 1071-1079.
- Ridgway, H.J., Baskarathevan, J., Amponsah, N., Jaspers, M.V., & Jones, E.E.** 2014. “The identity, distribution and diversity of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards – a national perspective”. *Phytopathologia Mediterranea* **53**: 565.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., and Gubler, W. D.** 2005. Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Dis.* **89**: 867-871.
- Rubio, J.J., & Garzón, E.** 2011. “Las enfermedades de madera de vid como amenaza del sector vitícola”. *Revista Winetech Noviembre*: 18-21.
- Savocchia, S., Steel, C. C., Stodart, B. J. and Somers, A.** 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species from declining grapevines in subtropical regions of Eastern Australia. *Vitis* **46**: 27-32.
- Serra, S., Mannoni, M. A., and Ligios, V.** 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathol. Mediterr.* **47**: 234-246.
- Siebert, J.B.** 2001. “Eutypa: The economic toll on vineyards”. *Wines & Vines April*: 50-56.
- Slippers, B., et al.** 2017. Diversity in the Botryosphaerales: looking back, looking forward. *Fungal Biol.*
- Songy A., Vallet J., Gantet M., Boos A., Fontaine, F.** 2019. Sodium arsenite effect on *Vitis vinifera* L. Physiology. *Journal of Plant Physiology* **238**: 72–79.

- Sosnowski, M. R., Loschiavo, A. P., Wicks, T. J., and Scott, E. S.** 2013. Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Dis.* **97**: 1599-1604.
- Sosnowski, M. R., McCarthy, G.** 2017. Economic impact of grapevine trunk disease management in Sauvignon Blanc vineyards of New Zealand. *Wine Vitic. J.* **32**: 42-48.
- Sosnowski, M. R., Shtienberg, D., Creaser, M. L., Wicks, T. J., Lardner, R., and Scott, E. S.** 2007. The influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa* dieback in grapevines. *Phytopathology* **97**:1284-1289.
- Sosnowski, M. R., Wicks, T. W., and Scott, E. S.** 2011. Control of *Eutypa* dieback in grapevines using remedial surgery. *Phytopathol. Mediterr.* **50**: S277-S284.
- Spagnolo A., Larignon P., Magnin-Robert M., Hovasse A., Cilindre C., Fontaine F.,** 2014. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Mourvèdre) to the *Botryosphaeria* dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 9644–9669.
- Spagnolo A., Mondello V., Larignon P., Villaume S., Rabenoelina F., Fontaine F.,** 2017. Defense responses in grapevine (cv. Mourvèdre) after inoculation with the *Botryosphaeria* dieback pathogens *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* and their relationship with flowering. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 393.
- The Plant List.** 2013. Version 1.1. [<http://www.theplantlist.org/>] Acedido a 6 de fevereiro de 2020 .
- Toussoun, T. A., Bega, R. V., Nelson, P. E.** 1970. Root diseases and soil-borne pathogens. University of California, Berkeley.
- Úrbez-Torres, J. R.** 2011. The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopatologia Mediterranea* **50**: S5-S45.
- Úrbez-Torres, J. R., Battany, M., Bettiga, L. J., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R. J., Verdegaal, P., Gubler, W. D.** 2010. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Dis.* **94**: 717-724.
- Úrbez-Torres J.R. and W.D. Gubler, 2009.** Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* **93**: 584–592.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D.** 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathol.* **60**: 261-270.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., and Gubler, W. D.** 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* **92**: 519-529.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., Gubler, W. D.** 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* **90**: 1490-1503.

- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., Gubler, W. D.** 2013. Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Dis.* **97**: 1571-1579.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Trouillas, F. P., Gubler, W. D.** 2016. Pomegranate dieback caused by *Lasiodiplodia gilanensis* in California. *Eur. J. Plant Pathol.* **148**: 223-228.
- Valencia, D., Torres, C., Camps, R., Lopez, E., Celis-Diez, J. L., Besoain, X.** 2015. Dissemination of Botryosphaeriaceae conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile. *Phytopathol. Mediterr.* **54**: 394-402.
- van Niekerk, J. M., Calitz, F. J., Halleen, F., Fourie, P. H.** 2010. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* **127**: 375-390.
- van Niekerk, J. M., Calitz, F. J., Halleen, F., Fourie, P. H.** 2011. Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* **50**: S139-S150.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H. and Halleen, F.** 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* **96**: 781-798.
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Hallen, F., Crous, P.** 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* **45**: S43 – S54.
- Vaz, A. T. A.** 2007. *Caracterização de fungos dos géneros Botryosphaeria e “Botryosphaeria-like” em videira*. MSc thesis, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.
- Waite, H., May, P.** 2005. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathol. Mediterr.* **44**: 144-152.
- Waite, H., Whitelaw-Weckert, M., Torley, P.** 2015. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **43**: 144-161.
- Weyand, K. and Schultz, H.** 2006. Long-term dynamics of nitrogen and carbohydrate reserves in woody parts of minimally and severely pruned Riesling vines in a cool climate. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 172-182.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. Em: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wilcox, W. F., Gubler, W. D., Uyemoto, J. K.** 2015. Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, 2nd Ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

## **Anexos**

### **Anexo 1**

Protocolo adaptado do protocolo da Qiagen DNeasy Plant Minikit:

1. Foram pesados 100 mg de amostra fresco
2. Buffer AP1 1h na estufa de vidro. Ir buscar gelo.
3. Ligar incubadora antes de começar a trabalhar (programar 65°C)
4. Usar P1000 para 400µL buffer AP1. Usar P10 para 4µL RNase A. Vortexar vigorosamente.
5. Incubar a 65°C por 10 minutos. De 3 em 3 minutos abanar os tubos por inversão.
6. Usar P200 para 130µL Buffer AP2, abanar tubos e incubar 5 minutos em gelo. Centrifugar 5 minutos a 14000 RPM (Rotações por minuto) à temperatura de 10/12°C.
7. Retirar o líquido sem perturbar o depósito (pellet) para colunas lilás. Centrifugar 2 minutos a 14000 RPM à temperatura de 10/12°C.
8. Retirar o líquido para tubo eppendorf determinando o volume aproximado com micropipeta entre os 400 e 450µL.
9. Multiplicar o volume obtido por 1,5 que será o valor de Buffer AP3 a colocar. Misturar pipetando.
10. Colocar 650µL do líquido numa coluna branca. Centrifugar 1 minuto a 8000RPM e descartar líquido. Repetir o processo descartando o líquido e o tubo redondo.
11. Novo tubo coletor com a coluna branca. Usar P1000 para 500µL de Buffer Av e centrifugar 1 minuto a 8000 RPM. Descartar o líquido e não o tubo redondo.
12. Repetir o processo adicionando mais 500µL de Buffer Av e neste caso centrifugar 2 minutos a 14000 RPM. Descartar o líquido e o tubo redondo.
13. Colocar coluna num tubo eppendorf sem tampa. Usar P100 para colocar 50µL de Buffer AE diretamente na membrana. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a 8000 RPM.
14. Repetir o processo adicionando mais 50µL de Buffer AE e incubar 5 minutos à temperatura ambiente. Transferir para tubo eppendorf definitivo após centrifugação.

## **Anexo 2**

illustra™ ExoProStar™ Ezymatic PCR and Sequencing Clean-up Kit

1. Retirar a Fosfatase Alcalina e a Exonuclease I do congelador e mantenha-as em gelo enquanto prepara o resto da reação.
2. Tirar 5µL da reação de PCR finalizada.
3. Adicionar 1µL da Fosfatase Alcalina à mistura de reação.
4. Adicionar 1µL da Exonuclease I à mistura de reação.
5. Incubar a 37°C durante 15 minutos
6. Incubar a 80°C durante 15 minutos para inativar as enzimas.
7. O produto final de PCR está pronto para uso em sequenciações ou outras aplicações.

## Anexo 3



# Esquive® WP

### Grapevine

Biofungicide against wood trunk diseases in grapevine : ESCA, BDA, Eutypiosis – AMM N° 2080004

### Description

Esquive WP is a biofungicide from a *Trichoderma atroviride* strain. It protects against vine and wood diseases : eutypiosis, ESCA and Black Dead Arm (BDA).

Sole product on the market registered and authorized for these applications ESQUIVE® WP also meets the requirements of the organic farming.

### Product benefits

- Protects pruning wounds from pathogen fungi responsible for wood and vine diseases
- Limits the development of wood and vine diseases and reduces vine dieback
- Reduces coplanting and maintains a high potential yield of the vineyard
- Installation and penetration of the beneficial microorganism in the wood 1 hour after the application (at 10°C)
- Speed of growth faster than pathogenic responsible for the vine and wood diseases
- Possible application in cold and wintry period : from 5°C
- Significant decrease of the pathogen in the wood
- 6 months at room temperature (20°C) and 18 months if cold storage (5°C)

### Mode of action

Esquive WP acts by antagonism, mycoparasitism, competition and antibiosis.

### Product informations

Composition : *Trichoderma atroviride* strain I-1237 – 10<sup>8</sup> UFC (spores) per g.

Formulation : (WP)

Standard dosage : 4 kg/ha

Method of application : foliar application or brush application on pruning wounds

Packaging: bags of 1 kg

Esquive can be used in organic farming

### Table of uses

Crops	Uses	Doses	Use specifications	PHI
Grapevine	ESCA, Black Dead Arm (BDA) and Eutypiosis	4.0 kg/ha	1 treat. /year	BBCH 00
		100.0 g/L	1 treat. /year	BBCH 00

# Tessior®

Suspensão concentrada para aplicação directa (SD), contendo 10 g/L ou 0.95% (p/p) de boscalide e 5 g/L 0.487% (p/p) piraclostrobina

Contém 2-METIL-2H-ISOTIAZOL-3-ONA, MISTURA DE: 5-CLORO-2-METIL-4-ISOTIAZOLINA-3-ONA e 2-METIL-2H-ISOTIAZOL-3-ONA (3:1). Pode provocar uma reacção alérgica.

**Fungicida para o controlo das doenças degenerativas do lenho da vinha, pertencentes ao complexo de organismos patogénicos responsáveis pela Esca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria dothídea*) e Eurípiose (*Eutypa lata*)**

**ESTE PRODUTO DESTINA-SE AO USO PROFISSIONAL**

**PARA EVITAR RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA E PARA O AMBIENTE  
RESPEITAR AS INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO**

**MANTER FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS**

Autorização de venda nº 1223 concedida pela DGAV

Nº de lote e data de produção, por razões técnicas em outro local do rótulo/embalagem.

**Titular da Autorização de Venda:**  
**BASF PORTUGUESA S.A.**  
Rua 25 de Abril, 1  
2689-538 Prior Velho  
Telefone: 219499900  
Fax: 219499949

® = Marca registrada de BASF

81135595 PT 1079



# 5 L

## Indicações relativas à sua utilização (incluindo as precauções biológicas)

TESSIOR® é um fungicida destinado ao combate das doenças degenerativas do lenho da videira,

apresentado numa formulação (SD), pronta a utilizar, especialmente desenvolvida por forma a combinar elementos de natureza física e de natureza química que, em conjunto, contribuem para a protecção das feridas da poda.

A protecção física é assegurada pelo Emuldur, um polímero que, após a pulverização sobre a superfície das feridas, endurece e protege as feridas com uma película durável evitando assim a entrada de esporos causadores da doença na planta. Paralelamente a esta barreira física, o TESSIOR® apresenta uma atividade química que resulta da associação de duas substâncias a piraclostrobina e o boscalide.

A piraclostrobina é uma substância ativa pertencente ao grupo químico das estrobilurinas (inibidor da respiração no complexo III (QoI)), com mobilidade translaminar, dotada de ação preventiva e curativa, através da inibição da germinação dos esporos e desenvolvimento do micélio dos fungos.

O boscalide é um fungicida sistémico, pertencente ao grupo das carboximidaz (inibidor da respiração do complexo II, inibindo o enzima succinato desidrogenase (SDHI)) com ação preventiva

#### **Utilizações, doses, concentrações e épocas e condições de aplicação**

**Videira Doenças degenerativas do lenho da vinha, pertencentes ao complexo de organismos patogénicos responsáveis pela Esca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* *Botryosphaeria dothidea*) e Euriose (*Eutypa lata*)**

O tratamento deverá ser realizado no Inverno/Primavera antes do início da rebentação (BBCH 00). Formulação pronta a aplicar não havendo necessidade de misturar com água. A dose a usar por hectare depende do número de feridas de poda, contudo por ferida deverão ser aplicados no máximo 0,65 ml/cm<sup>2</sup> correspondendo à dose de 0.3mL/ disparo. A dose máxima por hectare de 20L.

#### **Precauções biológicas**

Não realizar mais tratamentos do que aqueles indicados. Os tratamentos devem ser realizados na época de poda, aplicando o produto diretamente na ferida de poda logo após o corte.

Não aplicar o produto nos locais onde se verifiquem quebras de eficácia após aplicação repetida do mesmo.

#### **Modo de preparação da calda**

Mistura pronta a utilizar. Não necessita de diluição.

#### **Modo de aplicação**

Agitar antes de usar. Aplicação direta nas feridas de poda, utilizando equipamento específico.

#### **NOTA**

Os resultados da aplicação deste produto são susceptíveis de variar pela acção de factores que estão fora do nosso domínio, pelo que apenas nos responsabilizamos pelas características previstas na Lei.

# Tessior®

## Precauções Toxicológicas, Ecotoxicológicas e Ambientais

### Atenção

**EUH208** Contém 2-METIL-2H-ISOTIAZOL-3-ONA, MISTURA DE: 5-CLORO-2-METIL-4-ISOTIAZOLINA-3-ONA e 2-METIL-2H-ISOTIAZOL-3-ONA (3:1). Pode provocar uma reação alérgica.

**EUH210** Ficha de segurança fornecida a pedido.

**H315** Provoca irritação cutânea.

**H410** Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

### Indicações de Precaução (Prevenção):

**P101** Se for necessário consultar um médico, mostre-lhe a embalagem ou o rótulo.

**P264** Lavar com água e sabão cuidadosamente após manuseamento.

**P280** Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### Indicações de Precaução (Resposta):

**P303+P352** SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou com o cabelo): lavar com bastante sabão e água.

**P332+P313** Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

**P362+P364** Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

**P391** Recolher produto derramado.

### Indicações de Precaução (Eliminação):

**P501** Eliminar o conteúdo/recipiente em local adequado á recolha de resíduos perigosos.

**SP1** Não poluir a água com este produto ou com a sua embalagem.

**EM CASO DE INTOXICAÇÃO CONTACTAR O Centro de Informação Antivenenos, Telef.: 800 250 250**



**SPPT2** A embalagem vazia não deverá ser lavada, sendo completamente esgotado seu conteúdo, fechada, inutilizada e colocada em sacos de recolha, sempre que possível, devendo estes serem entregues num centro de receção autorizado.

