



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Áurea Leonor Cerqueira Gomes

**Estudos bioquímicos e moleculares sobre a Flavescência
Dourada com vista à sua deteção precoce em videira**

Dissertação no âmbito do Mestrado em

Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob orientação do

Professor Doutor Hernâni Varanda Gerós

e do

Doutor Henrique Noronha

“O homem vive conscientemente para si, mas serve inconscientemente de instrumento para atingir objetivos históricos, de toda a humanidade. Um ato cometido torna-se irreversível, e o seu efeito, coincidindo no tempo com milhões de atos de outros homens, adquire um significado histórico.”

Leon Tolstoi em “Guerra e Paz”

Agradecimentos:

Gostava de agradecer a todos que fizeram parte desta jornada, aos que me ajudaram diretamente a concretizar os objetivos desta dissertação, motivando-me e abrindo novas expectativas sobre investigação científica em plantas; e aos que estiveram sempre do meu lado, nos bons e menos bons momentos ao longo deste percurso.

Quero agradecer ao Professor Doutor Hernâni Gerós por aceitar ser o meu orientador, e por se mostrar sempre positivo perante as dificuldades que atravessamos ao realizar este trabalho. Também pela bondade e disponibilidade que sempre teve comigo. E por ser um excelente profissional e um exemplo a levar para o futuro.

Ao doutor Henrique Noronha, por estar sempre presente, por me ajudar a planear e executarmos ensaios do trabalho de investigação. Também por ser um investigador incrível, foi um privilégio trabalhar ao seu lado. Ainda por ser um excelente ser humano com qualidades que vão para além da sua perícia e desenvoltura como investigador.

Aos meus pais, por serem os melhores do mundo, por todo o amor que sempre me deram ao longo da vida. Ao meu namorado, por estar sempre do meu lado e me apoiar em tudo. Ao meu irmão pela força que sempre me transmitiu e por ser um bom exemplo para mim. À minha irmã, por ser o meu anjo da guarda. Aos meus sobrinhos Fábio e Gabriela por me terem ensinado outro tipo de amor. À restante família por fazerem parte da minha vida, por todo o amor e amizade que partilhamos, tornando este mundo um lugar melhor para viver.

À DVAG, em concreto à doutora Teresa Mota e Eng. João Garrido, por me receberem sempre bem e por nos facultarem as amostras biológicas que nos permitiram desenvolver este trabalho de investigação.

Ao meu amigo Simão Neves pela amizade verdadeira e por ser um companheiro de trabalho cheio de força e habilidade como investigador. Às minhas amigas Daniela e Telma por me apoiarem sempre e por me ajudarem a ultrapassar as dificuldades. A estes três últimos, um grande agradecimento por estarem entre as melhores pessoas que conheci até hoje!

À Andreia, Diana, Artur e a todos as outras pessoas do Laboratório de Biologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, pelos bons momentos que passamos juntos e por fazerem do nosso laboratório um lugar onde se desenvolve ciência com paixão em um ambiente tranquilo e confortável, onde é um prazer trabalhar.

Ao meu amigo e parceiro Teófilo, por tudo de bom que trouxe para a minha vida.

A todos que fazem parte da minha vida todos os dias, que me amam e a quem eu amo, que estiveram do meu lado nesta parte do meu percurso e estarão presentes no restante caminho a percorrer!

Resumo

A Flavescência Dourada (FD) é uma doença da videira causada pelo fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis* e propagada pelo vetor cicadelídeo *Sacaphoideus titanus* Ball. Esta doença foi identificada em diversas áreas vitivinícolas da Europa, incluindo em Portugal onde se encontra largamente disseminada nas vinhas da região norte do país. Uma vez que ainda não se encontram disponíveis tratamentos curativos, a utilização de testes de diagnóstico sensíveis torna-se fundamental para o seu controlo. Os objetivos da presente tese consistiram na otimização de um protocolo de rastreio da FD numa vinha da região Demarcada dos Vinhos Verdes, recorrendo a métodos de PCR em tempo real e no estudo das alterações metabólicas induzidas pelo fitoplasma em plantas infetadas. Neste âmbito, em 2014 e 2015 foram amostrados tecidos de videiras da variedade Loureiro saudáveis e com sintomas inequívocos de FD que foram alvo de estudos analíticos, bioquímicos e de biologia molecular. Os resultados demonstraram que os protocolos de PCR em tempo real, representam um procedimento rápido, sensível e específico para o diagnóstico de rotina de fitoplasmas num elevado número de amostras. O conteúdo em açúcares redutores nos tecidos foliares de plantas sintomáticas, medido pelo método do DNS, sofreu um aumento de 73% relativamente ao controlo. Estudos de HPLC mostraram que o conteúdo em sacarose aumentou em 26%. Em paralelo, foi observado que em folhas de plantas sintomáticas o conteúdo em fenólicos totais aumentou em 57% e o conteúdo em clorofilas totais decresceu 42% relativamente aos controlos. A infeção pelo parasita induziu ainda uma diminuição significativa do teor de amido acumulado nas varas no final da estação. Os níveis de transcritos dos transportadores de açúcar *VvSWEET1*, *VvSUC12* e *VvSUC27* foram estudados em folhas de plantas sintomáticas e de plantas saudáveis por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que a infeção por *Ca. Phytoplasma vitis* reprimiu a expressão destes transportadores de açúcares envolvidos no carregamento do floema, podendo contribuir para o aumento dos açúcares nos tecidos foliares disponíveis para o desenvolvimento da infeção. A expressão dos genes do metabolismo secundário *VvPAL*, *VvFLS* e *VvUFGT* foi também estudada nos tecidos foliares, tendo sido observada uma redução significativa dos níveis de transcritos do gene *VvFLS*. A relevância do presente trabalho prende-se com a elevada importância científica do estudo das interações fitoplasma-hospedeiro, contudo, a identificação de marcadores moleculares da infeção poderá revestir-se de uma dimensão aplicada importante por contribuir para o estabelecimento de novos métodos de diagnóstico.

Abstract

The “Flavescence Dorée” (FD) is a grapevine disease caused by the phytoplasma *Candidatus* *Phytoplasma vitis*, which is propagated by the Cicadellidae *Sacaphoideus titanus* Ball. This disease was identified in several European wine producing regions, including Portugal, where it is widely disseminated in the vines of the northern part of the country. Because no curative treatments are available so far, its detection through sensitive diagnostic tests is vital for its control. In the present thesis, we aimed to optimize of a protocol to track the incidence of FD in a vineyard of “Região Demarcada dos Vinhos Verdes” based in Real-Time PCR methods, and to study the metabolic alterations induced by the phytoplasma in infected plants. For this purpose, vine tissues from symptomatic and control plants of the Loureiro variety were sampled during two consecutive seasons, 2014 and 2015, and were subjected to analytical, biochemical and molecular biology studies. Results showed that the optimized Real-Time PCR protocols proved to be at quick, sensitive and specific procedure for routine diagnosis of the phytoplasmas in a significant number of samples. The content in reducing sugars in leaf tissues of infected plants, measured with the DNS method, increased by 73% when compared to the control. HPLC studies showed that sucrose content increased by 26%. Also, in leaves of infected plants the content of total phenolics increased by 57% while the total chlorophyll content decreased by 42% when compared with the controls. The parasite infection also induced a significant decrease in the starch accumulated in the canes at the end of the season. The transcript levels of the sugar transporters *VvSWEET1*, *VvSUC12* and *VvSUC27* were studied in leaves from both symptomatic and asymptomatic plants by Real-Time PCR. Results showed that the infection by *Ca. Phytoplasma vitis* repressed these sugar transporters involved in phloem loading, which may contribute towards the increase of sugars in leaf tissues available for the development of the infection. The expression of the genes of the secondary metabolism *VvPAL*, *VvFLS* e *VvUFGT* was also studied in leaf tissues, and a significant reduction in the transcript levels of *VvFLS* was observed. The relevance of the present work comes from the high scientific importance of the study of plant-microbe interactions, but the identification of molecular markers behind the infection may have a significant practical applied dimension, as it may contribute for the establishment of new diagnosis methods.

Índice

Agradecimentos:	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas	XIV
Abreviaturas e Acrónimos	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Videira e a sua importância socioeconómica.....	3
1.2 Fitoplasmas.....	4
1.3 Fitoplasmas em videira.....	5
1.3.1. Propagação da doença.....	6
1.4 Flavescência Dourada.....	6
1.4.1 Sintomas morfológicos.....	8
1.4.2 Características moleculares da Flavescência Dourada.....	10
1.4.3 Características do vetor.....	10
1.4.5 Estratégias de combate.....	11
1.4.6 Métodos de deteção.....	12
1.4.6.1 Técnicas baseadas em PCR.....	13
1.5 Objetivos.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Material Biológico.....	19
2.2 Extração de DNA.....	20
2.3 Primers utilizados para deteção da Flavescência Dourada.....	21
2.4 Deteção de Flavescência Dourada por PCR em Tempo Real.....	22
2.5 Extração de RNA.....	22

2.6 Síntese do cDNA	23
2.7 Primers para o estudo de expressão de genes	23
2.8 Quantificação de açúcares por HPLC	23
2.8.1 Quantificação dos açúcares redutores.....	24
2.8.2 Quantificação do amido	24
2.9 Quantificação das clorofilas	25
2.10 Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	25
2.11 Propagação vegetativa por enraizamento de estacas provenientes de varas de plantas com Flavescência Dourada e saudáveis.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 A técnica de PCR em tempo real revelou-se eficaz na deteção do fitoplasma da Flavescência Dourada em pecíolos de folhas de plantas sintomáticas da casta Loureiro.....	29
3.2. Em folhas de videira cv. Loureiro infetadas ocorre uma diminuição acentuada do conteúdo em clorofilas.....	32
3.3. Em folhas de videira cv. Loureiro infetadas, os níveis de açúcares redutores e não redutores aumentam significativamente.....	33
3.4. As folhas de videiras cv. Loureiro infetadas acumulam níveis superiores de compostos fenólicos do que as folhas de plantas assintomáticas	36
3.5. As varas atempadas de videiras cv. Loureiro infetadas acumulam níveis inferiores de amido	37
3.6. Em videiras cv. Loureiro infetadas ocorre reprogramação ao nível transcripcional de genes de transportadores de açúcares.....	38
3.7. Em videiras cv. Loureiro infetadas ocorre reprogramação ao nível transcripcional de enzimas do metabolismo secundário	40
3.8. Em estacas lenhosas enraizadas de videiras cv. Loureiro contaminadas não foi detetada a infeção por FD.....	43
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	47
5. BIBLIOGRAFIA	51

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição europeia do fitoplasma da Flavescência Dourada em 2014. Os pontos vermelhos demonstram a presença da doença (Chuche e Thiéry, 2014).	7
Figura 2. Distribuição da FD em Portugal Continental (Andrade et al, 2014).	8
Figura 3. Sintomas morfológicos de Flavescência Dourada (FD) em folhas de variedade tintas (A); e em variedades brancas (B). Sintomas de FD nas inflorescências (C); e em varas (D). Fotos cedidas pela EVAG / CVRVV.....	9
Figura 4. Distribuição das vinhas e do vetor do fitoplasma da FD na Europa. Áreas marcadas a rosa: vinhas sem a presença do vetor. Áreas pintadas a vermelho: vinhas colonizadas pelo <i>S. titanus</i> (Chuche e Thiéry, 2014).....	11
Figura 5. Visualização aérea da Estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG). A) Local da primeira amostragem em 2014; B) Local da segunda amostragem em 2015.....	19
Figura 6. Esquema do material recolhido nas amostragens de 2014 e 2015 e respetivos ensaios laboratoriais.	21
Figura 7. Videiras da casta Loureiro com sintomas de Flavescência Dourada (A), e assintomáticas (B) sinalizadas em 2015.....	30
Figura 8. Resultados do PCR em tempo real para a deteção de fitoplasmas em <i>Vitis vinifera</i> variedade Loureiro. (A) Pecíolo da planta controlo 2014; (B) Pecíolo da planta com FD-2014; (C) Pecíolo da planta controlo 2015; (D) Pecíolo da planta com FD-2015. Curvas referentes à deteção do gene constitutivo da videira (GPT); fitoplasmas (UNI), Bois Noir (BN) e Flavescência Dourada (FD).....	31
Figura 10. Resultados da quantificação dos açúcares redutores totais (frutose, glucose, sacarose, manose e maltose). As concentrações dos açúcares redutores totais foram determinadas usando a curva de calibração da glucose (mg equivalentes de glucose / g PF).	34
Figura 11. Resultados da quantificação de frutose obtida por HPLC.....	35
Figura 12. Resultados da quantificação de sacarose obtida por HPLC.	35
Figura 13. Resultados da quantificação dos fenólicos totais presentes nas amostras de videira com FD em comparação com os presentes na videira controlo. A absorvância das amostras foi medida no espectrofotómetro a 750 nm. As concentrações dos fenólicos foram determinadas usando a curva de calibração do ácido gálico [EAG].	36

Figura 14. Resultados da quantificação do amido presente nas amostras de videiras com FD e controlo. A absorvância das amostras foi medida no espectrofotómetro a 540 nm. As concentrações dos açúcares redutores foram determinadas usando a curva de calibração da glucose (amido mg equivalentes de glucose/ g PF).	38
Figura 15. Resultados do PCR em tempo real para a expressão relativa de genes envolvidos no transporte de açúcares.	39
Figura 16. Resultados obtidos por PCR em tempo real da expressão génica relativa de genes envolvidos no metabolismo secundário de <i>Vitis vinifera</i>	41
Figura 17. Estacas obtidas por regeneração de varas de videira: A: Planta com FD (varas atempadas); B: Planta com FD (varas não atempadas); C: Planta saudável (controlo).	44

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica da bactéria <i>Candidatus Phytoplasma vitis</i> , agente causador da doença Flavescência Dourada (FD).	6
Tabela 2. <i>Primers</i> desenhados para deteção de fitoplasmas no presente estudo.....	22
Tabela 3. <i>Primers</i> para os genes envolvidos no transporte de açúcares	23
Tabela 4. <i>Primers</i> para genes envolvidos no metabolismo secundário.	23
Tabela 5. Caraterização das videiras da casta Loureiro que foram estudadas por se apresentarem com sintomas de infeção pelo fitoplasma da Flavescência Dourada.	29
Tabela 6. Resultados da deteção de fitoplasmas em <i>Vitis vinifera</i> cv. Loureiro 2014 e 2015 por PCR em tempo real para a presença (+) ou ausência (-) de fitoplasmas nos vários tecidos de uma planta controlo e de uma sintomática.....	32
Tabela 7. Esquema cronológico da propagação vegetativa das videiras para análise por PCR em tempo real para diagnóstico de Flavescência Dourada.	43
Tabela 8. Resultados do PCR em tempo real da deteção de fitoplasmas nos vários tecidos vegetais de uma videira saudável e outra com FD. <i>Primer</i> UNI: <i>primer</i> universal para fitoplasmas; <i>Primer</i> FD: <i>primer</i> para deteção de Flavescência Dourada; <i>Primer</i> VvGPT: <i>primer</i> para amplificação de um gene constitutivo da videira (Controlo interno).	45

Abreviaturas e Acrónimos

β-ME – β-mercaptoetanol

BN – “*Bois Noir*”

Ca. Phytoplasma vitis – *Candidatus* Phytoplasma vitis

CTAB – “Cethyl-trimethyl-ammonium bromide”

CVRW – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes

DAPI – “4'-6-diamidino-2-phenylindole”

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DNS – 3,5 - Dinitrossalicilato

EDTA – “Ethylenediaminetetraacetic acid”

EPPO – European Plant Protection Organization

EVAG – Estação Vitivinícola Amândio Galhano

EY – “*Elm yellows*”

FD – Flavescência Dourada

EAG – Ácido gálico

GLRaV – “Grapevine leafroll – associated virus”

GY – “*Grapevine yellows*”

HPLC – “High-performance liquid chromatography”

HWT – “Hot Water Treatment”

AIB – Ácido indolbutírico

MET – Microscópio Eletrónico de Transmissão

MEV – Microscópio Eletrónico de Varrimento

MLOs – “*Mycoplasma-like organisms*”

NaOAc – Acetato de sódio

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

RFLP – “Restriction fragment length polymorphism”

RT-qPCR – Real Time – quantitative PCR

SCSB – Sistema de Condução Simples Bilateral

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

VvFLS – “*Vitis vinifera* Flavonol Synthase”

VvPAL – “*Vitis vinifera* Phenylalanine ammonia-lyase”

VvSUC12 – “*Vitis vinifera* Sucrose transporter 12”

VvSUC27 – “*Vitis vinifera* Sucrose transporter 27”

VvSWEET1 – “*Vitis vinifera* Sugars will eventually be exported transporter 1”

VvUFGT – “*Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase”

1. INTRODUÇÃO

1.1 Videira e a sua importância socioeconómica

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das árvores de fruto economicamente mais importante ao nível mundial (Vivier e Pretorius, 2002). Esta planta foi domesticada a partir de populações selvagens de *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* através da seleção de genótipos hermafroditas e do desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa, originando plantas com frutos maiores, mais doces, e de cores atraentes (Arroyo-Garcia *et al.*, 2006). Os estudos mais recentes apontam para que a sua domesticação tenha ocorrido por volta de 4000 a.C. na área a nordeste do atual Afeganistão até às fronteiras meridionais do Mar Negro e do Mar Cáspio (Aradhya *et al.*, 2003), tendo sido introduzida em Portugal por volta de 500 a.C. (Vid e Actuales, 2001).

A produção de vinho representa uma herança multicultural que se tem desenvolvido ao longo dos séculos, tornando a viticultura e a enologia uma mistura entre ciência, arte, tradição e inovação. A área cultivada com vinha na União Europeia (4,139,975 ha) ascende a 55% do total da área cultivada ao nível mundial, onde se produz cerca de 67% do vinho anualmente produzido no mundo (Delrot, 2010).

Em Portugal, o cultivo da vinha representa um dos principais sectores económicos. Em 2014 a área cultivada com vinha ascendeu a 178986 ha, originando uma produção de 6033 t de vinho (Instituto Nacional de Estatística, 2015).

Apesar de ser extensamente cultivada devido à elevada qualidade do fruto e à sua capacidade de crescer numa ampla gama de condições climáticas, a videira é extremamente suscetível a doenças (Eweldt e Possingham, 1988), pelo que os tratamentos fitossanitários representam normalmente um custo muito elevado para os viticultores.

A videira pode ser afetada por doenças causadas por diversos organismos patogénicos, incluindo bactérias (*Xylella fastidiosa*, doença de Pierce), fungos (Oídio e Mildio), fitoplasmas (Flavescência Dourada; Bois Noir), pragas (*Daktulosphaira vitifoliae*, filoxera) e vírus (doença do enrolamento da folha: causada por um complexo de oito vírus; *Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV). Algumas destas doenças provocam elevadas perdas de produção e, frequentemente, tornam-se fatores limitantes ao cultivo no caso de não serem adotadas medidas de controlo adequadas.

O presente trabalho de investigação focou-se nas infeções causadas pelo fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis* responsável pela doença da Flavescência dourada (FD), que tem afetado recentemente amplas produções vitivinícolas em Portugal.

1.2 Fitoplasmas

Os fitoplasmas são bactérias patogênicas intracelulares, que afetam plantas por todo o mundo (Green *et al.*, 1999; Malembic-Maher *et al.*, 2007). São as únicas bactérias que conseguem invadir eficientemente as células de insetos e plantas, organismos pertencentes a dois reinos distintos (Bai *et al.*, 2006).

Os fitoplasmas foram inicialmente identificados em 1967 no floema de plantas infetadas com a doença “Yellows”, enfermidade esta que se pensava ser provocada por viroses. No entanto, ao serem identificados corpos sem parede celular pleomórficos e devido à sua similitude com micoplasmas, foram denominados *Mycoplasma-like organisms* (MLOs) (Doi *et al.*, 1967).

Nos anos 90 do séc. XX ainda eram descritos como MLOs, inseridos na classe dos Mollicutes, e associados a doenças em centenas de espécies de plantas (Ahrens e Seemüller, 1992). Posteriormente, análises filogenéticas de sequências de DNA desses organismos mostraram tratar-se de um grupo diverso, monofilético, e o termo fitoplasma foi proposto e adotado para os descrever (Dickinson *et al.*, 2013).

Os fitoplasmas são parasitas obrigatórios, não-helicoidais, filamentosos, delimitados por uma membrana plasmática, sem núcleo e sem qualquer organelo ligado à membrana simples (Andrade e Arismendi, 2013; Devonshire, 2013).

Apresentam uma forma pleomórfica, por não possuírem parede celular, e diâmetro entre 100-800 nm (Andrade e Arismendi, 2013; Devonshire, 2013). Apresentam também genomas pequenos (530-1350 kpb) revelando uma importante heterogeneidade dentro e entre os grupos filogenéticos (Marcone *et al.*, 1999) e um conteúdo baixo de G+C (23-29 %) (Dickinson *et al.*, 2013).

A evolução favoreceu a redução do genoma dos fitoplasmas, como consequência da sua vida como parasita intracelular obrigatório, num ambiente rico em nutrientes, levando à perda de muitas vias metabólicas essenciais (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). Com efeito, o genoma dos fitoplasmas não contém diversos genes que codificam enzimas de vias metabólicas essenciais, como o ciclo de Krebs, vias de biossíntese de esteróis e de ácidos gordos, da cadeia transportadora de elétrons e do sistema de fosforilação oxidativa. Para além destes, ainda carece dos genes para o sistema de fosfotransferase e para metabolizar UDP-galactose em glucose 1-fosfato, sugerindo que os fitoplasmas têm mecanismos de incorporação de açúcar e sistemas metabólicos únicos (Razin *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006).

No entanto, o genoma dos fitoplasmas contém pelo menos 27 genes que codificam sistemas transportadores de nutrientes minerais e orgânicos, tais como o malato, aminoácidos e iões metálicos, e alguns destes genes estão presentes em múltiplas cópias. E embora os fitoplasmas careçam de vários genes considerados essenciais para as células de replicação autónoma, em vez disso, eles possuem genes transportadores envolvidos na captação de substâncias a partir do citoplasma de células hospedeiras (Oshima *et al.*, 2004).

O consumo dos metabolitos pelos fitoplasmas perturbam o equilíbrio metabólico nas células hospedeiras, e alteram negativamente diversos processos fisiológicos, incluindo o balanço hormonal (Hogenhout *et al.*, 2008), o transporte de aminoácidos, a translocação de hidratos de carbono, e a fotossíntese. Adicionalmente aceleram processos de senescência e modificam a morfologia dos tecidos infetados causando os sintomas da doença (Lepka *et al.*, 1999; Oshima *et al.*, 2004).

Contudo, muitos destes aspetos ainda não se encontram bem estudados do ponto de vista molecular e bioquímico, pela impossibilidade dos fitoplasmas serem cultivados *in vitro* o que representa uma limitação importante à sua identificação e estudo.

1.3 Fitoplasmas em videira

As doenças da videira causadas por fitoplasmas são denominadas de *Grapevine yellows* (GY) (Angelini *et al.*, 2001). Estima-se que diferentes fitoplasmas afetam as videiras em todo o mundo, contudo, não podem ser identificados rigorosamente com base nos sintomas observáveis (Boudon-Padieu *et al.*, 2003).

Na Europa, os fitoplasmas mais comuns são o *Candidatus* Phytoplasma vitis e o *Candidatus* Phytoplasma solani que causam as doenças da Flavescência Dourada e o Bois Noir (BN), respetivamente (Gambino *et al.*, 2013; Andrade e Arismendi, 2013).

Como foi referido anteriormente, os fitoplasmas não são cultiváveis em laboratório, por isso a sua identificação e classificação teve em consideração as diferenças no gene 16S do DNA ribossomal, levando à identificação de diferentes grupos filogenéticos. O fitoplasma associado ao BN está incluído no grupo 16SrXII-A também denominados por grupo *Stobur*, e é transmitido pelo inseto *Hyalesthes obsoletus* Sign. (Hemiptera: Cixiidae), que se alimenta ocasionalmente da seiva floémica da videira (Mori *et al.*, 2002). Por outro lado, o fitoplasma *Ca.* Phytoplasma vitis pertence ao grupo 16Sr-V (subgrupos 16Sr-VC ou 16Sr-VD), também designado por grupo *Elm Yellows* (EY),

e é transmitido pelo inseto *Scaphoideus titanus* Ball. (Homoptera Cicadellidae), de origem americana (Mori *et al.*, 2002; Bianco *et al.*, 2004; Angelini *et al.*, 2007; Hren *et al.*, 2007).

1.3.1. Propagação da doença

Como referido acima, os fitoplasmas são transmitidos entre plantas por insetos que se alimentam do floema da videira, onde se alojam (Andrade e Arismendi, 2013), devido à sua capacidade de alterar a sua morfologia conseguindo atravessar os plasmodesmos e alcançar todos os órgãos da planta (Boudon-Padieu *et al.*, 2003; Devonshire, 2013).

A doença pode ser ainda propagada através de enxertia e propagação vegetativa de varas com infeções latentes, sem apresentarem sintomas (Arnaud *et al.*, 2007).

Os prejuízos económicos causados por fitoplasmas podem ser muito elevados, uma vez que a produtividade das plantas é frequentemente diminuída, podendo a colheita ser completamente perdida (Belli *et al.*, 2010). Adicionalmente, a qualidade do vinho pode ser também afetada negativamente (Margaria *et al.*, 2013).

1.4 Flavescência Dourada

Como referido anteriormente, a FD é causada pelo fitoplasma *Ca. Phytoplasma vitis* (Tabela 1) e tem como vetor o inseto *S. titanus* Ball. (Homoptera Cicadellidae). Atualmente, trata-se de uma doença com elevada incidência ao nível das vinhas europeias (Angelini *et al.*, 2001), sendo que todas as variedades de *V. vinifera* apresentam algum grau de suscetibilidade (Margaria *et al.*, 2013).

Tabela 1. Classificação taxonómica da bactéria *Candidatus Phytoplasma vitis*, agente causador da doença Flavescência Dourada (FD).

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Mollicutes
Ordem	Acholeplasmatales
Família	Incertae sedis
Género	<i>Candidatus</i> Phytoplasma
Espécie	<i>Candidatus</i> Phytoplasma vitis

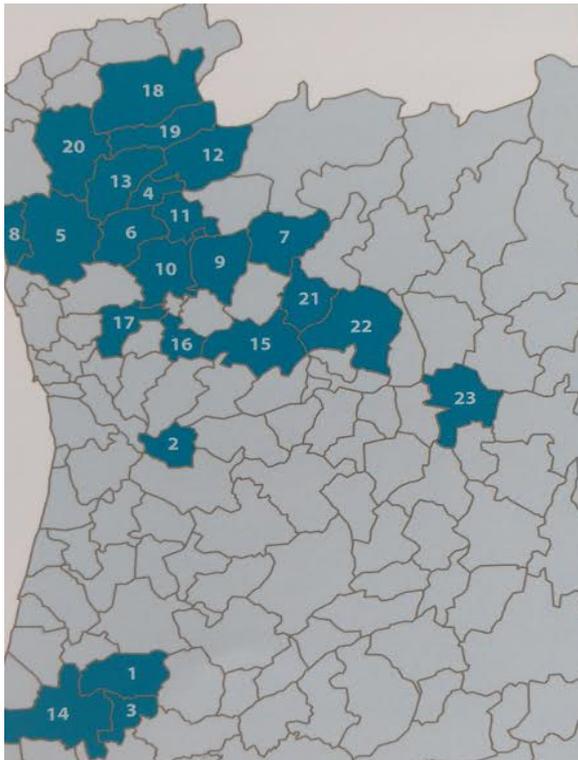
A FD está classificada como uma doença de quarentena na lista da Diretiva 2000/29 da União Europeia (EU) sobre os organismos prejudiciais, e na lista A2 da Organização Europeia e Mediterrânea da Proteção das Plantas (EPPO). Estas diretivas visam a destruição de plantas com sintomas e plantas circundantes, bem como o controlo do seu vetor *S. titanus*. (Kogovšek *et al.*, 2015).

O primeiro caso descrito de videiras contaminadas com FD ocorreu no sudoeste da França na década de 50 do século passado, de onde se espalhou para outras zonas vinícolas da França, norte de Itália e países europeus vizinhos (Marzachi *et al.*, 2001). Actualmente, esta doença de quarentena tem um impacto económico negativo elevado não só nos dois países maiores produtores de vinho da Europa, França e Itália, mas também em Espanha, Suíça, Áustria, Croácia, Eslovénia, Sérvia, Hungria, Roménia e Portugal (Figura 1) (Abbà *et al.*, 2014).



Figura 1. Distribuição europeia do fitoplasma da Flavescência Dourada em 2014. Os pontos vermelhos demonstram a presença da doença (Chuche e Thiéry, 2014).

Em Portugal a doença foi detetada pela primeira vez em 2006 em duas vinhas da região vitivinícola do Minho. Actualmente está presente em vários concelhos da região Norte e foi igualmente confirmada em 2010 na região Centro (DGAV, 2013).



- 1 – Anadia
- 2 – Castelo de Paiva
- 3 – Mealhada
- 4 – Amares
- 5 – Barcelos
- 6 – Braga
- 7 – Cabeceira de Bastos
- 8 – Esposende
- 9 – Fafe
- 10 – Guimarães
- 11 – Póvoa de Lanhoso
- 12 – Terras de Bouro
- 13 – Vila Verde
- 14 – Cantanhede
- 15 – Amarante
- 16 – Lousada
- 17 – Santo Tirso
- 18 – Arcos de Valdevez
- 19 – Ponte da Barca
- 20 – Ponte de Lima
- 21 – Mondim de Basto
- 22 – Vila Real
- 23 – São João da Pesqueira

Figura 2. Distribuição da FD em Portugal Continental (Andrade et al, 2014).

Reconhecendo os elevados estragos provocados pela FD nas vinhas e as correspondentes perdas económicas para o setor vitícola nacional, a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), coordenou um Grupo de Trabalho que elaborou o “Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada”, colocado em prática desde 2013 (DGAV, 2013).

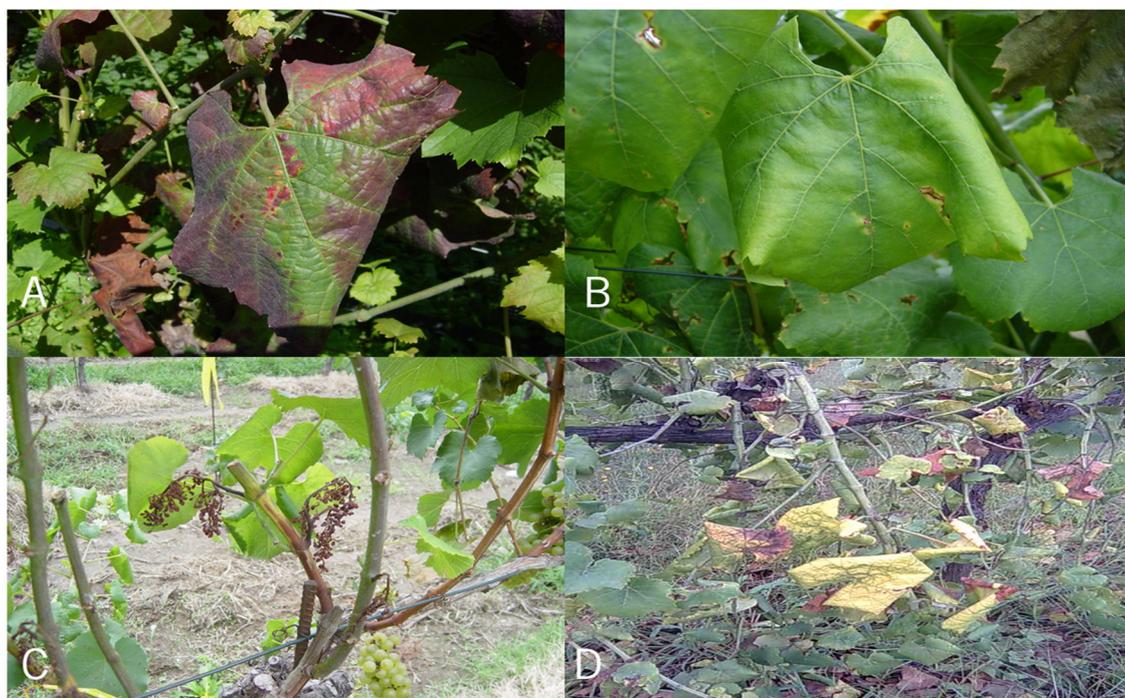
1.4.1 Sintomas morfológicos

A descrição pormenorizada dos sintomas foi feita por Caudwell em 1957 e complementada mais tarde por Belli e colaboradores (Caudwell, 1957; Belli *et al.*, 1973). Os sintomas incluem o desenvolvimento de flores verdes e perda dos pigmentos das flores normais, esterilidade, alongamento anormais dos entrenós, descolorações das folhas e o seu enrolamento. Em casos severos de infeção pode ocorrer necrose do floema e a morte da planta. Estes sintomas tornam-se evidentes durante o verão, apesar de ser possível identificar videiras infetadas com fitoplasmas durante a primavera devido ao crescimento reduzido/nanismo da planta, germinação irregular e atrasada, pela redução do número de gomos e necrose dos mesmos, encurtamento dos entrenós e necrose de inflorescências (Margaria *et al.*, 2013). Toda a planta pode desenvolver sintomas, quando a infeção ocorreu no ano anterior, ou apenas em algumas ramificações, caso tenha ocorrido no início da época (Belli *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2013).

Os gomos das videiras infetadas na primavera falham a lignificação, tornando-se finos e avermelhados, e mais tarde tornam-se quebradiços e muitas vezes necrosados com sintomas de necrose apical e lateral (Harrison *et al.*, 2013; Margaria *et al.*, 2013).

As folhas das videiras infetadas com FD no início do verão sofrem enrolamento para a página inferior acompanhado de coloração roxa-avermelhada nas variedades tintas (Figura 3A) ou amarela-dourada em variedades brancas, sintoma que deu origem ao nome da doença (Figura 3B) (Gambino *et al.*, 2013). Ao longo da época, aparecem nas veias principais manchas de alguns mm de diâmetro que se estendem a grande parte da folha. A parte central das áreas descoloridas torna-se frequentemente necrótica e seca. Estas folhas frágeis e rígidas podem ser removidas pelo vento, mas geralmente suportam as geadas do outono e sofrem deiscência depois das folhas saudáveis (Belli *et al.*, 2010); Harrison *et al.*, 2013). As inflorescências de videiras infetadas mais precocemente normalmente secam e caem (Figura 3C). Nas infeções tardias, os cachos tornam-se castanhos e enrugados e podem sofrer abscisão à menor perturbação (Harrison *et al.*, 2013). As varas amadurecem de forma irregular, mantendo a cor verde por falta de lignificação tornando-se descaídas (Figura 3D) (Belli *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2013).

Figura 3. Sintomas morfológicos de Flavescência Dourada (FD) em folhas de variedade tintas (A); e em variedades brancas (B). Sintomas de FD nas inflorescências (C); e em varas (D). Fotos cedidas pela EVAG / CVRVV.



Outros sintomas menores podem ser observados, dependendo da suscetibilidade da variedade, do estado fisiológico, das condições ambientais e da fase de desenvolvimento

vegetativo. Em variedades suscetíveis, ou quando as condições ambientais são apropriadas para a infecção ocorrer, as vinhas enfraquecem rapidamente e podem morrer em poucos anos, especialmente se reinoculadas várias vezes pelo inseto vetor (Belli *et al.*, 2010).

Os sintomas podem desenvolver-se sete dias após a infecção da planta, ou mais tardiamente, de 6 a 24 meses (Hogenhout *et al.*, 2008). Também podem ocorrer infecções mistas, isto é, as plantas podem ser contaminadas com BN e FD, apresentando sintomas semelhantes aos descritos para a FD (Marzachi *et al.*, 2001).

1.4.2 Características moleculares da Flavescência Dourada

A caracterização molecular e análise filogenética de dois loci (*uvrB-degV*) do gene *SecY* mostrou a existência de três tipos de estirpes de FD: FD1 (incluindo a estirpe FD-70, proveniente de França), FD2 (estirpes FD92 e FD-D, proveniente de França e Itália), e FD3 (estirpe FD-C, proveniente da Itália) (Davis e Dally, 2001; Arnaud *et al.*, 2007).

Para investigar a diversidade do fitoplasma FD e os determinantes genéticos que regulam o seu ciclo de vida, o projeto de sequenciação do seu genoma foi iniciado há alguns anos. Após a sequenciação do cromossoma da estirpe FD92, o seu tamanho foi calculado em 671 Kbp (Malembic-Maher *et al.*, 2007).

Com base na informação já disponível resultante da sequenciação do genoma, foi possível confirmar que este microrganismo apresenta um metabolismo direcionado para a degradação e transporte de proteínas, e o seu metabolismo energético parece depender apenas da glicólise e da importação e degradação de maltose e do 2-hidroxicarboxilato. O transporte destes compostos utiliza a energia livre associada com um gradiente de H⁺ transmembranar gerado pela atividade de P-ATPases, que se encontram bem representadas no seu genoma (Carle *et al.*, 2011).

1.4.3 Características do vetor

O cicadelídeo *S. titanus* é o vetor natural do *Ca. Phytoplasma vitis* e alimenta-se do floema da videira, como já referido, estando provido de um aparelho bucal que lhe permite perfurar os tecidos da planta. A relação nutricional entre a planta e o *S. titanus* é do tipo obrigatório, visto que a sua sobrevivência é totalmente dependente da videira (Belli *et al.*, 2010).

S. titanus foi detetado pela primeira vez em França em 1958 e disseminou-se posteriormente para a maioria das vinhas francesas e europeias. Atualmente encontra-se de oeste para leste, a partir de Portugal para a Roménia, e de norte para sul, da região de Champagne em França para Basilicata em Itália (Figura 4) (Chuche e Thiéry, 2014). Em Portugal, o inseto vetor

foi capturado pela primeira vez em 1998, em Arcos de Valdevez, e em 2000 foi oficialmente confirmada a sua presença em Vila Real (Mesquita 2013).

O ciclo de vida deste inseto compreende cinco estágios larvais que se desenvolvem de maio até julho. A forma adulta surge no final de julho e está presente até o início de setembro. O processo de transmissão do fitoplasma da FD por *S. titanus* é composto por três etapas distintas: a aquisição, o período de latência e a inoculação. O inseto incorpora o fitoplasma por se alimentar de plantas infetadas, seguindo-se um período de latência de duas ou mais semanas, durante as quais o microrganismo se multiplica nos seus órgãos e na hemolinfa (Hogenhout *et al.*, 2008). Depois do fitoplasma atingir as glândulas salivares do inseto atinge-se a fase da inoculação, período no qual o *S. titanus* consegue contaminar outras plantas. Quer as larvas quer os insetos adultos são capazes de incorporar o fitoplasma da videira, mas as formas adultas são mais eficientes na propagação da FD, visto que conseguem deslocar-se a distâncias maiores disseminando mais eficazmente a doença (Belli *et al.*, 2010). Não há nenhuma evidência de transmissão adulto-ovo (Harrison *et al.*, 2013)

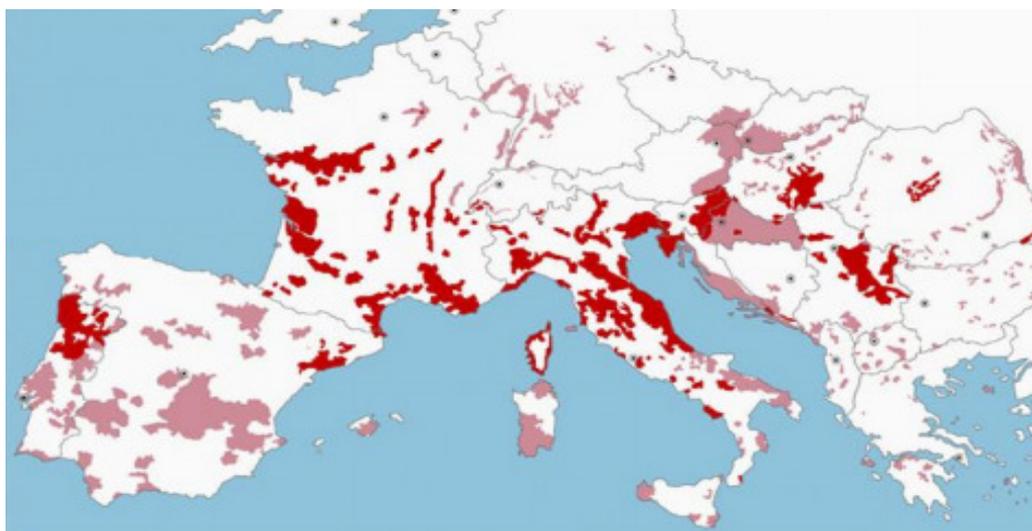


Figura 4. Distribuição das vinhas e do vetor do fitoplasma da FD na Europa. Áreas marcadas a rosa: vinhas sem a presença do vetor. Áreas pintadas a vermelho: vinhas colonizadas pelo *S. titanus* (Chuche e Thiéry, 2014).

1.4.5 Estratégias de combate

O ciclo biológico de *Ca. Phytoplasma vitis* envolve uma planta hospedeira e um único inseto vetor, estritamente dependente da planta hospedeira para a sua sobrevivência, o que tem permitido o desenvolvimento de diversas estratégias de controlo, com base em tratamentos inseticidas contra populações de *S. titanus* (Belli *et al.*, 2010). Estes tratamentos com inseticidas são obrigatórios até duas ou três vezes por ano, comportando um impacto ambiental negativo

(Gambino *et al.*, 2013) e aumentando assim os custos de produção (Bianco *et al.*, 2004; Hren *et al.*, 2007).

As estratégias de monitorização no local e de modelação matemática podem ser uma ferramenta eficaz para prever a dinâmica populacional do *S. titanus* bem como a sua taxa de dispersão, e podem ser um suporte válido para a tomada de decisão na gestão de controlo da população através de aplicações otimizadas de inseticida (Maggi *et al.*, 2013).

Para se evitar a dispersão da doença através da propagação vegetativa, outra estratégia de controlo consiste no tratamento do material lenhoso com água quente (HWT) (Caudwell *et al.*, 1990). No entanto, este tratamento deve ser cuidadosamente aplicado, pois pode interferir com a vitalidade do material lenhoso de propagação. Com efeito, foi observada uma forte variabilidade na taxa de sobrevivência das plantas, dependendo da variedade e do tipo de material lenhoso sujeito ao tratamento pelo calor (Mannini, 2007).

Um dos principais constrangimentos na prevenção FD consiste na falta de ferramentas rápidas e sensíveis para deteção do fitoplasma e a sua identificação (Mehle *et al.*, 2013).

1.4.6 Métodos de deteção

A deteção de fitoplasmas é difícil devido à sua distribuição irregular dentro do hospedeiro e, frequentemente, à sua reduzida concentração nos tecidos que pode ser dependente da estação do ano e das condições ambientais. (Kogovšek *et al.*, 2015).

Pelo facto de as “*Grapevine yellows*” apresentarem sintomas que podem ser facilmente confundidos com outras doenças da videira, e mesmo entre si, tem sido feito um esforço considerável para se otimizarem técnicas de diagnósticos confiáveis.

Um dos métodos desenvolvidos para a deteção consiste na microscopia eletrónica de transmissão (MET) e varrimento (MEV), que oferecem a oportunidade de visualizar em detalhe a ultra estrutura dos fitoplasmas (Devonshire, 2013). No entanto, a MET e MEV são técnicas relativamente dispendiosas, requerendo equipamentos muito especializados que não se encontram facilmente acessíveis. Além disso, as técnicas de microscopia eletrónica são apenas eficazes quando os fitoplasmas estão presentes em elevada quantidade nos tecidos (Ahrens e Seemüller, 1992).

Os genomas sequenciados de alguns fitoplasmas são ricos em A+T, uma característica que favorece a sua deteção com o marcador fluorescente 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) uma vez que este marcador tem a capacidade de permeabilizar as membranas celulares e se ligar

fortemente a estas regiões do DNA (Andrade e Arismendi, 2013). Após coloração com DAPI, os tecidos infetados apresentam geralmente pontos brilhantes correspondentes a fitoplasmas nos tubos crivosos do floema, ausentes nos tecidos saudáveis (Arismendi *et al.*, 2010). A técnica de coloração com DAPI é considerada um método rápido e preciso de localização de fitoplasmas nos tubos crivosos do floema de diferentes tecidos, tais como galhos, folhas, pecíolos e raízes (Arismendi *et al.*, 2010; Andrade e Arismendi, 2013). Adicionalmente este procedimento é relativamente rápido e pouco dispendioso (Andrade e Arismendi, 2013) mas a sua grande limitação consiste na necessidade de se utilizarem cortes de material recente. Por outro lado, o método exibe alguma inespecificidade, dado que é incapaz de distinguir diferentes espécies de fitoplasmas (Andrade e Arismendi, 2013).

Uma outra técnica bastante comum para deteção de microrganismos em plantas baseia-se na utilização de anticorpos específicos por ELISA. Esta técnica, revelou-se útil para a deteção de fitoplasmas em plantas hospedeiras herbáceas, mas não mostrou sucesso quando aplicada a videiras ou outras plantas lenhosas, possivelmente devido à reduzida concentração do microrganismos nos tecidos e à sua distribuição errática (Belli *et al.*, 2010). Além disso, este método pode não permitir a diferenciação de fitoplasmas (Ahrens e Seemüller, 1992).

Considerando que as técnicas de deteção de fitoplasmas por microscopia eletrónica, por marcação com DAPI e por ELISA evidenciam uma sensibilidade limitada e por não serem apropriadas para o estudo de um elevado número de amostras, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais precisas por abordagens de biologia molecular (Green *et al.*, 1999; Belli *et al.*, 2010).

1.4.6.1 Técnicas baseadas em PCR

O primeiro passo para a deteção de fitoplasmas envolve o isolamento do material genético que vai servir de molde para os ensaios de PCR ou de RFLP. Genericamente estão disponíveis três protocolos distintos: i) obtenção de um sedimento rico em fitoplasmas seguindo-se a extração de DNA (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Ahrens e Seemüller 1992; Daire *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1993); ii) extração total de DNA após homogeneização dos tecidos na presença de um detergente forte (Daire *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 2001); iii) extração total de DNA usando *kits* comerciais.

Diversas abordagens de PCR têm sido otimizadas para a detetar fitoplasmas em videira com *primers* apropriados, sendo que uma das mais comuns consiste na deteção por *nested*PCR. Nesta técnica, são usados *primers* específicos para uma determinada espécie de fitoplasma na

primeira reação de PCR, usando os produtos amplificados como molde num segundo PCR, promovendo-se o aumento exponencial do número de cópias amplificadas e um sinal mais forte.

O método RFLP para detecção da FD foi desenvolvido a partir de um fragmento de 558 pb tendo como modelo o gene 16S rRNA do DNA e dois oligonucleotídicos das regiões conservadas deste gene (Ahrens e Seemüller, 1992). Geralmente, este método de detecção consiste na amplificação de um determinado fragmento de DNA por *nested*-PCR seguido da sua digestão por diversas enzimas de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. O produto da digestão é depois analisado após corrida num gel de poliacrilamida para se obter uma boa resolução do perfil de digestão. Os perfis de polimorfismo de restrição são então comparados e os padrões específicos são usados para classificar os fitoplasmas em grupos e subgrupos 16Sr (Angelini *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2013).

O PCR em tempo real (qPCR) tem sido utilizado recentemente para a detecção específica de fitoplasmas em videira (Bianco *et al.*, 2004; Hren *et al.*, 2007). A detecção de FD já foi conseguida utilizando um ensaio com TaqMan, que envolve um passo de PCR convencional, antes do qPCR (Bianco *et al.*, 2004). Recorrendo ao TaqMan, grupos de investigação diferentes desenharam primers e sondas específicas para a FD e o BN (Angelini *et al.*, 2007; Hren *et al.*, 2007). A detecção por PCR em tempo real com SYBR Green também provou ser eficaz para a detecção de fitoplasmas em videiras infetadas com FD e BN, bem como em amostras de insetos (Galletto *et al.*, 2005).

Estes métodos são bastante sensíveis, específicos e robustos na detecção de fitoplasmas de videira. A vantagem do *nested*-PCR combinada com o RFLP consiste na sua especificidade, permitindo a distinção de diferentes estirpes de FD ou BN, embora se trate de uma abordagem relativamente longa e exigente. Por outro lado, as abordagens de qPCR são rápidas, envolvem menos manipulação das amostras, evitando-se contaminações, e são compatíveis com protocolos de diagnóstico para grande número de amostras, o que se afigura importante no contexto atual de elevada incidência da doença em vinhas de toda a Europa (Delrot *et al.*, 2010; Mehle *et al.*, 2013).

1.5 Objetivos

Os objetivos deste trabalho consistiram na otimização de um protocolo de rastreio da Flavescência Dourada numa vinha da casta Loureiro da região Demarcada dos Vinhos Verdes, recorrendo a métodos de PCR em tempo real, e no estudo das alterações metabólicas induzidas pelo fitoplasma em plantas infetadas. A relevância do presente trabalho advém da elevada importância científica do estudo das interações planta-fitoplasma, pois a identificação de marcadores moleculares da infeção poderá revestir-se de uma dimensão aplicada importante por contribuir para o estabelecimento de novos métodos de diagnóstico. Neste âmbito, em 2014 e 2015, foram amostrados tecidos de videiras saudáveis e com sintomas inequívocos de FD que foram alvo de estudos analíticos, bioquímicos e de biologia molecular. Foram ainda estudados os sintomas da doença e rastreada a presença de *Ca. Phytoplasma vitis*, em material resultante da propagação vegetativa por enraizamento de estacas provenientes de varas de plantas sintomáticas e assintomáticas.

Os resultados mostraram que os protocolos de PCR em tempo real otimizados representam um procedimento rápido, sensível e específico para o diagnóstico de rotina de fitoplasmas num elevado número de amostras.

Em plantas infetadas com FD foram aplicados métodos analíticos de quantificação de açúcares, clorofilas e compostos fenólicos totais em folhas e do amido em varas atempadas. Estudos de biologia molecular permitiram estudar a expressão de genes envolvidos no metabolismo primário em folhas, em particular de transportadores de açúcares, como *SWEET1*, *SUC12* e *SUC27*, e secundário, incluindo genes que codificam enzimas da via dos fenilpropanóides como a PAL, a FLS e a UFGT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

As amostras biológicas foram obtidas na Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV) situada na Estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG). Este organismo foi criado em 1984, compreendendo 66 hectares de área e localiza-se em Arcos de Valdevez, Norte de Portugal (41°48'56.12"N; 8°24'38.41"W).

Para estudar o efeito da infeção pelo fitoplasma da Flavescência Dourada (FD) na videira foram realizadas duas amostragens de plantas da variedade Loureiro, sendo a primeira amostragem efetuada em novembro de 2014 no local A e a segunda em maio de 2015 no local B da Figura 5



Figura 5. Visualização aérea da Estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG). A) Local da primeira amostragem em 2014; B) Local da segunda amostragem em 2015.

Em novembro de 2014 foram alvo de estudo uma planta controlo (sem sintomas) e uma planta com sintomas de FD, que se encontravam no estado vegetativo de fim de queda de folhas correspondente ao período de armazenamento de reservas. As plantas sintomáticas apresentavam folhas mais amareladas e quebradiças e varas mal atempadas relativamente às plantas sem sintomas. As plantas foram cultivadas numa parcela plantada em 1988, com espaçamento 2.80 × 2 m, em Sistema de Condução Simples Bilateral (SCSB). O controlo de fertilização e de pragas e doenças seguiu as normas da produção integrada. Foram recolhidas folhas, pecíolos e varas

atempadas e não atempadas, para detecção de fitoplasmas e também para propagação vegetativa (Figura 6).

Nos estudos de 2015 foram procuradas outras plantas sintomáticas, dado que os exemplares de 2014 com FD foram eliminados de acordo com o “Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada em videira”, implementado em 2013.

Em maio, quando as videiras se encontravam no estado vegetativo de “Bago tamanho de Chumbinho” foram alvo de estudo uma planta assintomática três plantas com sintomas de FD, por apresentarem descoloração amarelenta, encurtamento dos entrenós, nanismo das folhas e cachos mais pequenos com menos bagos, quando comparada com a planta assintomática.

As videiras da parcela da qual foram recolhidas as amostras foram designadas oficialmente como Loureiro B clone 82 ISA (PT), foram plantadas em 2009 com espaçamento 2.80×2 m em Sistema de Condução Simples Bilateral (SCSB). O controlo de fertilização e de pragas e doenças seguiu as normas da produção integrada.

Os tecidos vegetais recolhidos foram folhas com pecíolos para detecção de fitoplasmas e para a realização de ensaios bioquímicos e moleculares (Figura 6). No laboratório as amostras foram congeladas em azoto líquido, maceradas e conservadas a -80 °C.

2.2 Extração de DNA

Em cada condição foram utilizados 300 mg de material biológico, ao qual se adicionou 1 mL de tampão CTAB (“cethyl-trimethyl-ammonium bromide”) suplementado com 2% (v/v) e β -mercaptoetanol (β -ME). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 60 °C durante 30 min, seguindo-se uma centrifugação de 5 min a 15000 g para remover o material insolúvel. Ao sobrenadante adicionou-se 1 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 (v/v)), seguindo-se uma centrifugação de 15 min a 15000 g, para separar a fase orgânica da fase aquosa, que foi recuperada. Este passo foi repetido mais uma vez. À fase aquosa adicionou-se 0,1 volumes de 3 M acetato de sódio e 0,3 volumes de 2-propanol, seguindo-se uma incubação a -80 °C durante 30 min. A solução foi de seguida centrifugada durante 30 min a 18000 g a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com etanol a 70% (v/v), ressuspenso em H_2O ultrapura. O RNA foi removido das amostras após uma incubação de 30 min com $0,5$ μ l de RNase a 37 °C. O ADN foi quantificado por espectrofotometria utilizando o Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) e a sua integridade foi conferida num gel de 1% de agarose suplementado com 0,5% da sonda SYBR-safe (Qiagen).

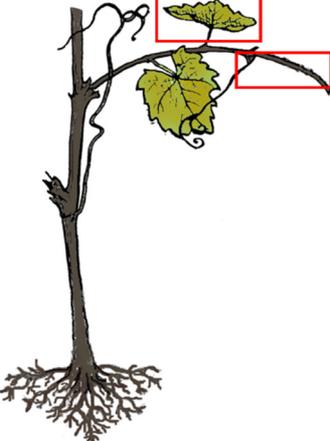
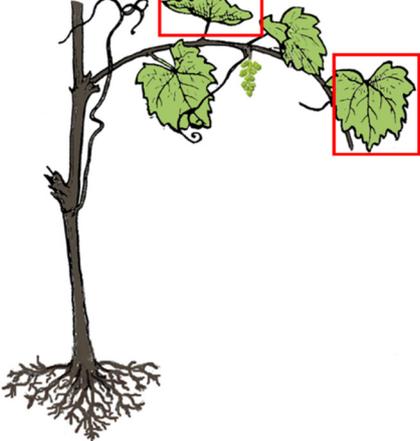
<p>Amostragem de Outubro 2014 (Uma planta sintomática e uma planta assintomática)</p>	<p>Tecidos amostrados / estudos desenvolvidos</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Folhas e pecíolos Deteção de fitoplasmas • Varas semilenhosas Deteção de fitoplasmas Quantificação de amido Propagação vegetativa
<p>Amostragem de Maio 2015 (Três Plantas sintomáticas e uma planta assintomática)</p>	<p>Tecidos amostrados / estudos desenvolvidos</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Pecíolos Deteção de fitoplasmas • Folhas Quantificação de clorofilas Quantificação de açúcares redutores totais Quantificação de fenólicos Estudos da expressão de genes

Figura 6. Esquema do material recolhido nas amostragens de 2014 e 2015 e respetivos ensaios laboratoriais.

2.3 Primers utilizados para deteção da Flavescência Dourada

Os *primers* utilizados para a deteção do fitoplasma da FD bem como o *primers* universais e os utilizados para a deteção do fitoplasma de BN tiveram em consideração o trabalho desenvolvido por Hren *et al.*, (2007) (Tabela 2). O teste de diagnóstico do fitoplasma da FD teve em consideração os *primers* específicos para os grupos 16SrV utilizando as sequências nucleotídicas do gene *secY* das estirpes FD-C, FD-D, FD70, FD92, FD2000 e HD1. Os *primers* para a deteção do fitoplasma da BN tiveram em consideração do DNA genómico da estirpe Stoll11. A necessidade de detetar a presença de BN prende-se com a semelhança dos sintomas desta doença com a FD. Os *primers* universais utilizam a região 16 rDNA e possibilitam a amplificação

da BN (16SrXII), e da FD (16SrV) (Hren *et al.*, 2007), e outros fitoplasmas, mas dando preferência à FD.

Tabela 2. *Primers* desenhados para detecção de fitoplasmas no presente estudo

Primers		
FD	Foward	5' TTA TGC CTT ATG TTA CTG CTT CTA TTG TTA 3'
	Reverse	5' TCT CCT TGT TCT TGC CAT TCT TT 3'
BN	Foward	5' AAG CAG GTT TAG CGA TGG TTG T 3'
	Reverse	5' TGG TAC CGT TGC TTC ATC ATT T 3'
Uni	Foward	5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3'
	Reverse	5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3'

2.4 Detecção de Flavescência Dourada por PCR em Tempo Real

O protocolo de PCR em Tempo Real foi adaptado de métodos já existentes no laboratório de Biologia Vegetal (Noronha *et al.*, 2015). O material utilizado para a detecção foi o ADN total isolado de diferentes partes da planta. Para cada reação, a mistura foi constituída por 5 µL de Mix Syber Green, 0,15 µL *Primer* Foward, 0,15 µL de *Primer* Reverse e 3,7 µL de H₂O ultrapura. O PCR em tempo real foi realizado no CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad). O protocolo de amplificação incluiu uma desnaturação inicial de 15 min a 95 °C, 45 ciclos de desnaturação de 15 seg a 95 °C, hibridação a 55 °C durante 30 seg e extensão a 72 °C durante 30 seg. A especificidade da reação foi confirmada através da curva de melting utilizando as temperaturas de 65 °C a 95 °C com um incremento de 0,5 °C.

2.5 Extração de RNA

O protocolo utilizado para o isolamento de RNA foi adaptado do kit comercial Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. Para cada condição, foram utilizados 300 mg de material biológico, ao qual se adicionou 1 mL de tampão CTAB suplementado com 2% (v/v) β-ME. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 60 °C durante 30 min, seguindo-se uma centrifugação de 5 min para remover o material insolúvel. Ao sobrenadante, adicionou-se 1 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 (v/v)), seguindo-se uma homogeneização e centrifugação de 15 min a 15000 *rpm*, para separar a fase orgânica da fase aquosa, que foi recuperada. Este passo foi repetido uma vez mais. À fase aquosa adicionou-se 0,1 volumes de 3 M NaOAc e 0,3 de 2-propanol, seguindo-se uma homogeneização e incubação a -80 °C durante 30 min. A solução foi de seguida centrifugada durante 30 min a 18000 *g* a 4 °C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi

ressuspensão em 100 µL de H₂O ultrapura e prosseguiu-se com o protocolo comercial, de acordo com as indicações do fabricante. Após tratamento com DNase, a integridade de RNA foi verificada em um gel de agarose a 1% suplementado com 0,5% da sonda SYBR-safe (Qiagen) e quantificado no Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

2.6 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi efetuada com o kit Omniscript RT (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

2.7 Primers para o estudo de expressão de genes

Os *primers* usados para estudar genes envolvidos no transporte de açúcares foram retirados do trabalho desenvolvido por Pastenes *et al.* (2014) (Tabela 3).

Os *primers* usados para estudar genes envolvidos no metabolismo secundário foram retirados do trabalho desenvolvido por Boubakri *et al.* (2013) (Tabela 4).

Tabela 3. *Primers* para os genes envolvidos no transporte de açúcares

Primers		
VvSWEET1	Foward	5' TTC TTG GCT CCA CTG TAT GG 3'
	Reverse	5' GCC CTC TCC TTC TTG ATT GA 3'
VvSUC12	Foward	5' ACC AGC CTC ACC ATT TAT CAG AC 3'
	Reverse	5' ATT TCA TAA CTG CTC TCA GGG TTG 3'
VvSUC27	Foward	5' TGC TTG GCA CTG ACG GTA CT 3'
	Reverse	5' GCT GTA GGT GAT CGC AAG AGG 3'

Tabela 4. *Primers* para genes envolvidos no metabolismo secundário.

Primers		
VvFLS	Foward	5' CCG AAC CGA ATC AAG GAC TG 3'
	Reverse	5' GTT CCA GCC ACT GAG ACA AT 3'
VvUFGT	Foward	5' TGC AGG GCC TAA CTC ACT CT 3'
	Reverse	5' GCA GTC GCC TTA GGT AGC AC 3'
VvPAL	Foward	5' CCG AAC CGA ATCA AGG ACT G 3'
	Reverse	5' GTT CCA GCC ACT GAG ACA AT 3'

2.8 Quantificação de açúcares por HPLC

Para quantificar os açúcares totais, adicionou-se 1 mL de etanol 80% (v/v) a 100 mg de amostra, homogeneizou-se e colocou-se num banho a 100 °C, durante 10 min. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 *rpm* durante 5 min, e o sobrenadante foi recuperado e

evaporado numa atmosfera de azoto gasoso. Os açúcares foram dissolvidos em 1 mL de H₂O ultrapura e sonicados num banho durante 30 min. Antes da injeção no HPLC, os extratos foram passados num filtro PTFE 0.2 µm. As análises cromatográficas foram realizadas num HPLC Hitachi Auto amostrador L-2200 Elite LaChrom emparelhado a um detetor RI. Foram injetados 20 µL de extrato e a taxa de fluxo foi mantida ao longo da análise a 0.5 mL.min⁻¹ a 60 °C. A coluna usada foi a Rezex RCM monossacarídeo Ca⁺² (8%) e o eluente foi água. A concentração de açúcares de cada amostra foi determinada pela comparação do pico da área com as curvas de calibração estabelecidas para cada composto.

2.8.1 Quantificação dos açúcares redutores

Para dosear os açúcares redutores totais, as amostras foram tratadas de forma semelhante ao descrito anteriormente. Em particular, as amostras foram extraídas com etanol 80% (v/v) a uma temperatura de 100 °C que foi utilizado para medir os açúcares redutores através do método DNS (Ácido Dinitrossalicílico). A absorvância das amostras foi medida no espectrofotómetro a 575 nm. As concentrações dos açúcares redutores totais foram determinadas usando a curva de calibração da glucose.

2.8.2 Quantificação do amido

Para a extração do amido, 100 mg de peso fresco de folhas de videira, foram utilizadas em 1 mL de etanol 80% (v/v), homogeneizadas e levadas a um banho a 120 °C durante 3 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas 5 min, e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o procedimento 5 vezes e colocou-se a parte insolúvel, que contém o amido a secar na estufa a 60 °C. De seguida as amostras foram ressuspensas em 2 mL de H₂O ultrapura e maceradas num almofariz. Aliquotas de 500 µL de amostra foram incubadas num banho a 120 °C durante 15 min de forma a gelatinizar o amido. A 250 µL de amostra adicionou-se 250 µL NaOAc (200 mM) e digeriram-se as amostras com 5 U de α-amilase e 10 U de β-amiloglucosidase. Aos restantes 250 µL apenas se adicionou 250 µL NaOAc (200 mM) para servir de controlo negativo. Todas as amostras foram incubadas 4 h a 37 °C e após uma centrifugação de 5 min a 1000 g, foram retirados 100 µL de extrato que foram utilizados para dosear os açúcares libertados pelo método de DNS.

2.9 Quantificação das clorofilas

Para a quantificação das clorofilas, 100 mg de amostra de folha foram misturados com 1 mL de acetona 80% (v/v) e homogeneizados vigorosamente. De seguida, as amostras foram incubadas durante 24 h a 4 °C no escuro, após o que foram centrifugadas durante 10 min a 6000 *g*. A absorvência foi medida a 663 e 646 nm (espectrofotómetro UV- visível). A concentração da clorofila nos extratos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foi calculada seguindo o método espectrofotométrico (Wellburn, 1994).

$$\text{Chl a} = 12.25 \times A_{663} - 2.79 \times A_{646}$$

$$\text{Chl b} = 21.5 \times A_{646} - 5.10 \times A_{663}$$

A quantidade de clorofila presente nos extratos foi calculada depois da normalização para peso seco de amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$).

2.10 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico do “Folin-Ciocalteu” (Waterhouse, 2002). Para cada condição, a 100 mg de amostra foi adicionado 1 mL de metanol, seguindo-se uma agitação de 15 min à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 18000 *g* durante 20 min e o sobrenadante foi recuperado. A 20 μL de sobrenadante foi adicionado 1,58 mL de água desionizada e 100 μL de reagente Folin, seguindo-se uma incubação de 5 min no escuro antes de se adicionar 300 μL de carbonato de sódio (2M). Após 2 h de incubação no escuro, a absorvência das amostras foi medida no espectrofotómetro a 750 nm. A concentração dos fenólicos totais foi determinada usando a curva de calibração do ácido gálico [GAE].

2.11 Propagação vegetativa por enraizamento de estacas provenientes de varas de plantas com Flavescência Dourada e saudáveis

Varas semilenhosas de videiras recolhidas em novembro de 2014 saudáveis e videiras com o fitoplasma da FD foram guardadas a 4 °C, durante 4 meses de forma a completarem o seu ciclo de vernalização.

As varas selecionadas (basais e médias) foram tratadas com uma solução de 1mg/mL da hormona ácido indolbutírico (AIB) para promover o enraizamento. Para tal, as estacas foram envasadas com terra na câmara de cultura com um programa de ciclo de luz de 16 h a 24 °C. Os vasos foram

regados de três em três dias. Ao fim de 2 meses, recolheu-se o material das plantas regeneradas por propagação vegetativa, incluindo as raízes, folhas e os pecíolos. Este material foi sujeito aos tratamentos anteriores para ser analisado por PCR em tempo real.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A técnica de PCR em tempo real revelou-se eficaz na deteção do fitoplasma da Flavescência Dourada em pecíolos de folhas de plantas sintomáticas da casta Loureiro

Como referido nos Materiais e Métodos, as amostragens de tecidos de videiras da variedade Loureiro com sintomas de FD e assintomáticas, foram feitas na EVAG/CVRVV em 2014 e 2015.

De acordo com a informação recolhida na EVAG, as castas Trajadura, Vinhão e Arinto são as que apresentam mais sensibilidade à infeção, sendo que a casta Loureiro é considerada a mais resistente. Não obstante, na parcela que foi alvo de estudo em 2015, com 661 videiras da casta Loureiro, foram eliminadas 5% das plantas com sintomas de FD por imposição do “Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada em videira” implementado em 2013. A caracterização das videiras sintomáticas da casta Loureiro sinalizadas em 2014 e 2015 é apresentada na Tabela 5

Tabela 5. Caracterização das videiras da casta Loureiro que foram estudadas por se apresentarem com sintomas de infeção pelo fitoplasma da Flavescência Dourada.

Plantas com sintomas	Data da recolha	Número de plantas	Idade das videiras	Estado vegetativo	Órgãos/tecidos recolhidos	Data de eliminação da videira
Loureiro FD 2014	Outubro de 2014	1	26 anos	Fim de queda de folhas, princípio de armazenamento de reservas	Folhas, pecíolos, varas atempadas e varas não atempadas	Novembro de 2014
Loureiro FD 2015	Maior de 2015	3	5 anos	Bago de tamanho de “chumbinho”	Folhas e pecíolos	Junho de 2015

Quando o trabalho foi iniciado em 2014, obtivemos a confirmação por PCR em tempo real que a planta sinalizada Loureiro-FD-2014 estava realmente infetada com o fitoplasma da FD, tendo posteriormente a mesma sido arrancada por imposição do “Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada em videira”. Antes, porém, da planta ser destruída algumas das suas varas semilenhadas foram guardadas e vernalizadas para darmos continuidade ao trabalho laboratorial no ano seguinte após enraizamento de estacas.

Contudo, em maio de 2015, foi-nos possível sinalizar mais três videiras com sintomas de FD (Figura 7), o que tornou possível dar continuidade ao trabalho experimental com plantas do

campo. Não foi possível, contudo seguir o curso da infecção e da resposta das plantas porque as mesmas foram arrancadas logo que a doença se tornou aparente. Ainda assim foi recolhido muito material vegetal que foi submetidos a estudos bioquímicos e moleculares.



Figura 7. Videiras da casta Loureiro com sintomas de Flavescência Dourada (A), e assintomáticas (B) sinalizadas em 2015.

Como referido no Material e métodos a deteção da FD foi feita por PCR em tempo real de acordo com o protocolo desenvolvido por Hren *et al.* (2007), recorrendo a *primers* específicos (Tabela 2). Uma vez que não é possível distinguir visualmente a FD da doença Bois Noir (BN), devido à semelhança dos sintomas (Vegetal *et al.*, 2004), utilizámos também *primers* específicos para esta doença. Como controlo interno, foram utilizados *primers* específicos do gene de videira *VvGPT* que codifica um transportador cloroplastidial de hexoses-Pi (Noronha *et al.*, 2015).

Nos ensaios realizados com as amostras de 2014, foram utilizadas nervuras de folhas, pecíolos e varas de plantas assintomáticas e de plantas com sintomas de infecção, com o objetivo de detetar, diagnosticar e compreender a distribuição da FD na planta. Nos ensaios com as amostras de 2015, apenas foram utilizados pecíolos de 3 plantas distintas, por sabermos antecipadamente que nesse tecido teríamos maior possibilidade de detetar a presença de FD. No entanto apenas detetamos FD em uma das plantas, e foi com o material vegetal dessa planta que realizamos os ensaios bioquímicos e moleculares.

Os resultados do PCR em tempo real comprovam o fitoplasma da FD foi detetada em pecíolos, e que as amostras de FD-2014 apresentam maior fluorescência do que FD-2015, o que pode indicar que no final da época os pecíolos têm maior concentração de fitoplasma (Figura 8).

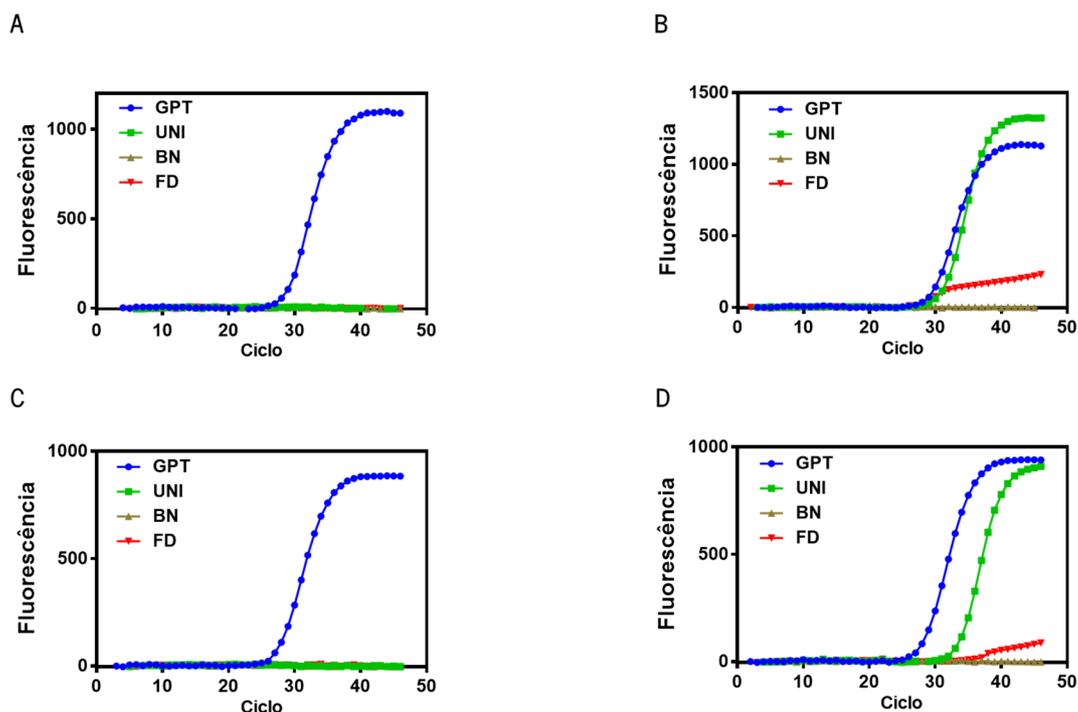


Figura 8. Resultados do PCR em tempo real para a detecção de fitoplasmas em *Vitis vinifera* variedade Loureiro. (A) Pecíolo da planta controlo 2014; (B) Pecíolo da planta com FD-2014; (C) Pecíolo da planta controlo 2015; (D) Pecíolo da planta com FD-2015. Curvas referentes à detecção do gene constitutivo da videira (GPT); fitoplasmas (UNI), Bois Noir (BN) e Flavescência Dourada (FD).

Os *primers* específicos utilizados para a detecção da FD tiveram em consideração sequências nucleotídicas do gene *secY* obtidas dos isolados FD-C, FD-D, FD70, FD92, FD2000 e FD1, os *primers* para o BN teve em consideração o DNA genómico da estirpe Stoll 11, enquanto que os *primers* universais utilizam a região 16 rDNA e possibilitam a amplificação do BN (16SrXII), da FD (16SrV) e outros fitoplasmas, apesar de serem mais específicos para infeções de FD. Os resultados estão apresentados na Figura 8 e na Tabela 6.

Como se pode verificar os resultados de PCR em tempo real permitiram confirmar que as plantas com sintomas (FD-2014 e FD-2015) se encontravam realmente infetadas com FD e não com Bois Noir. Além disto, apesar de terem sido analisados vários tecidos da FD-2014 apenas foi possível detetar a doença nos pecíolos da planta infetada.

A diferença de fluorescência entre a detecção de diferentes fitoplasmas utilizando os *primers* universais e a fluorescência detetada utilizando os *primers* específicos para a FD pode ser explicada pela variabilidade de estirpes de FD mesmo dentro dos diferentes grupos ribossomais causadores desta doença (16SrV) (Hren., et al 2007). A estirpe existente nas amostras poderá ser

diferente daquelas utilizadas para o desenho de *primers* diminuindo assim a sua especificidade para a sequência de DNA e a capacidade de deteção.

Tabela 6. Resultados da deteção de fitoplasmas em *Vitis vinifera* cv. Loureiro 2014 e 2015 por PCR em tempo real para a presença (+) ou ausência (-) de fitoplasmas nos vários tecidos de uma planta controlo e de uma sintomática.

Plantas		<i>Primers Específicos</i>			
		BN	FD	UNI	VvGPT
Controlo (2014/15)	Nervuras	-	-	-	+
	Pecíolos	-	-	-	+
	Varas	-	-	-	+
FD-2014	Nervuras	-	-	-	+
	Pecíolos	-	+	+	+
	Varas	-	-	-	+
FD-2015	Pecíolos	-	+	+	+

A técnica de PCR em tempo real revelou-se eficaz na deteção da FD em pecíolos de plantas sintomáticas nos dois anos. Apesar de existirem vários métodos de deteção de fitoplasmas o RT-qPCR continua a ser o método mais robusto, sensível e menos moroso como foi possível verificar durante a execução do protocolo e dos resultados obtidos. A sensibilidade da deteção conseguida foi devida, pelo menos em parte, à elevada especificidade dos *primers* utilizados para a estirpe de FD.

3.2. Em folhas de videira cv. Loureiro infetadas ocorre uma diminuição acentuada do conteúdo em clorofilas

A clorofila é o principal pigmento responsável pela captação da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese por isso a determinação da sua concentração normalmente é utilizada como um indicador de stresse biótico e/ou abiótico.

Para a realização deste ensaio foram usadas folhas da videira (controlo e FD-2015), retiradas de vários pontos da planta (folhas adultas e folhas jovens), maceradas e reservadas juntamente, constituindo assim as duas amostras que serão utilizadas também nos ensaios subsequentes.

Nas folhas infetadas com FD verifica-se uma diminuição do conteúdo de clorofilas estatisticamente significativa relativamente ($p=0,009$) às folhas provenientes de videiras saudáveis (controlo) constituindo uma perda aproximadamente de 42,2% (Figura 9). Este resultado é concordante com o facto do conteúdo de clorofilas diminuir com o contacto com fatores de stresse como a infeção por agentes patogénicos que poderá alterar as proteínas fotossintéticas que se tornam mais suscetíveis à degradação (Ji *et al.*, 2009). A diminuição do conteúdo em clorofilas também foi reportado em folhas da variedade de Chardonnay infetadas com BN (Bertamini *et al.*, 2002) bem como em folhas infetadas de macieira (*Pyrus malus* L) com o fitoplasma AP-MLO (Bertamini *et al.*, 2003). Este declínio da fotossíntese pode ser o efeito direto da infeção no transporte de eletrões e atividades enzimáticas (Bertamini *et al.*, 2003).

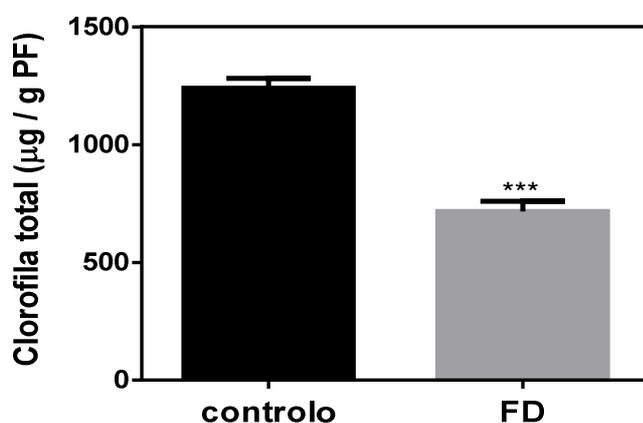


Figura 9. Resultados da concentração ($\mu\text{g/g PF}$) da clorofila total, existente em folhas de videira com FD em comparação com a existente em folhas de videira saudável (controlo). A unidade para a quantificação da clorofila total é expressa em $\mu\text{g/g}$ de peso fresco (PF). Os asteriscos representam o grau das diferenças significativas com $p\text{value} \leq 0,05$. A absorvência das amostras foi medida no espectrofotómetro a 663 nm e 646 nm.

3.3. Em folhas de videira cv. Loureiro infetadas, os níveis de açúcares redutores e não redutores aumentam significativamente

As folhas de plantas controlo e contaminadas com FD-2015, foram analisadas no que respeita ao seu conteúdo em açúcares redutores totais pelo método DNS e também por HPLC, o que permitiu quantificar a frutose e sacarose.

Os açúcares redutores totais, os quais incluem os monossacarídeos glucose, frutose e manose, e o dissacarídeo maltose, entre outros, encontram-se aumentados das plantas controlo para as infetadas com FD de 3.43 para 5.95 mg equivalentes de glucose g PF^{-1} ($p=0,0007$), respetivamente, o que corresponde a um aumento de 73% (Figura 10).

Tendo os fitoplasmas preferência por açúcares simples e sendo os açúcares redutores testados constituídos por açúcares simples verifica-se assim a mobilização destes açúcares em plantas infetadas com FD. A maltose pode ser mobilizada em plantas infetadas por FD porque os fitoplasmas contêm transportadores ABC capazes de captar maltose. O aumento dos açúcares redutores também foi verificado em milho infetado com fitoplasma responsável pelo enfezamento do milho (Junqueira *et al.*, 2004).

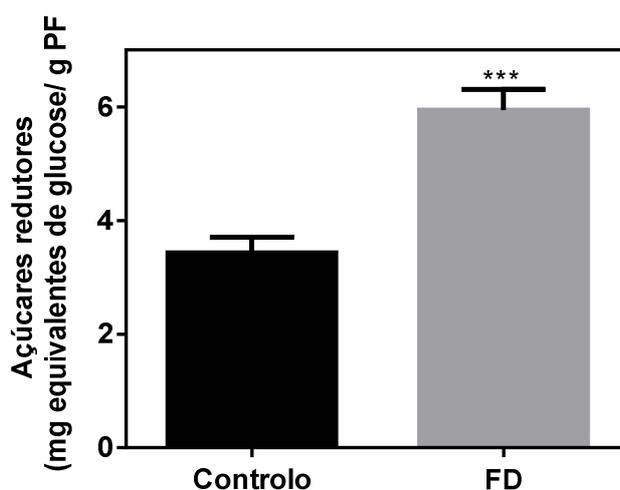


Figura 10. Resultados da quantificação dos açúcares redutores totais (frutose, glicose, sacarose, manose e maltose). As concentrações dos açúcares redutores totais foram determinadas usando a curva de calibração da glicose (mg equivalentes de glicose / g PF).

Para obter uma imagem mais clara do que ocorre ao nível dos açúcares em folhas de plantas infetadas com FD, procedeu-se a uma análise por HPLC. Nesta análise foi possível observar um aumento do conteúdo de frutose em folhas infetadas com FD relativamente às folhas isentas de doença, o que constitui um aumento de aproximadamente de 26% (Figura 11).

Um dos efeitos conhecidos causados por diferentes infeções por fitoplasmas é acumulação de frutose nas folhas. Isto foi descrito em folhas de milho infetadas com o fitoplasma responsável pelo enfezamento do milho (Junqueira *et al.*, 2004). Além disso, aquando da infeção por fitoplasmas, há um bloqueio na translocação de açúcares e proteínas seguida por um aumento de amido nas folhas e uma diminuição nas raízes (Vitali *et al.*, 2013). Conciliando o aumento dos níveis de frutose que tem sido observados com estudos de expressão génica foi possível sugerir que o fitoplasma altera enzimas envolvidas no metabolismo dos açúcares para obtenção de energia e para o seu crescimento (Hren *et al.*, 2009).

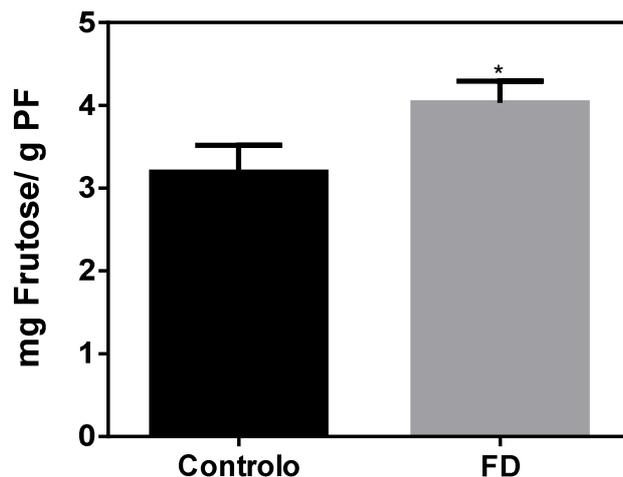


Figura 11. Resultados da quantificação de frutose obtida por HPLC.

Relativamente ao açúcar não redutor sacarose verificou-se também um aumento do seu conteúdo nas folhas infetadas com FD relativamente às folhas saudáveis (controlo) aproximadamente de 10%. Porém esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0.13$), (Figura 12).

Os fitoplasmas carecem de enzimas para utilização da sacarose no seu metabolismo utilizando glucose e frutose como fonte de carbono. Desta forma, células infetadas com fitoplasmas tendem a mobilizar mais sacarose e verifica-se também um aumento da expressão do gene *sacarose sintase (Susy)* após infeção que catalisa a clivagem da sacarose em UDP-glucose e frutose, devido à preferência dos fitoplasmas por açúcares simples (M. Hren *et al.*, 2009).

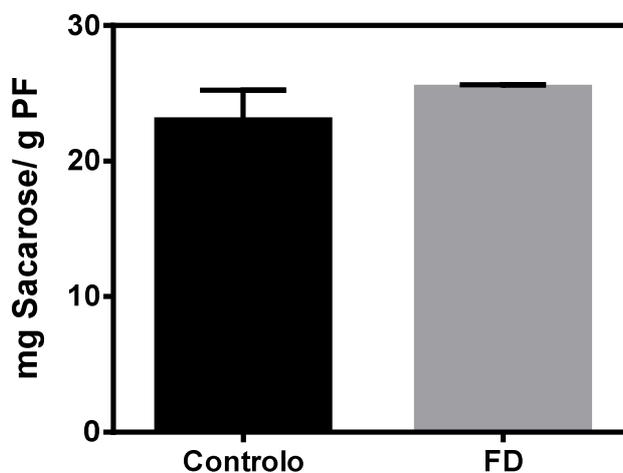


Figura 12. Resultados da quantificação de sacarose obtida por HPLC.

Resumidamente, verificou-se alteração do conteúdo de açúcares testados nas folhas infetadas com FD. Sem dúvida que a FD provoca alteração nos níveis de açúcar em plantas infetadas afetando o metabolismo dos açúcares em *Vitis vinifera*. Esta alteração ocorre devido à necessidade dos fitoplasmas mobilizarem açúcares para o seu desenvolvimento visto que o seu metabolismo responsável pela captação de açúcares é primitivo. Tendo em consideração estes resultados seria interessante perceber os componentes da célula que estão afetados e que provocam o aumento dos níveis de açúcar nas folhas infetadas com FD. Desta forma analisou-se a expressão génica de diferentes genes responsáveis pelo transporte de açúcares como o *VvSWEET1*, *VvSUC12* e *VvSUC27*.

3.4. As folhas de videiras cv. Loureiro infetadas acumulam níveis superiores de compostos fenólicos do que as folhas de plantas assintomáticas

Tendo sido descrito anteriormente que plantas infetadas com FD acumulam compostos fenólicos nas folhas, o conteúdo total destes compostos secundários foi quantificado.

Observou-se um aumento de 20,0 para 31,4 mg EAG g PF⁻¹ nas plantas infetadas, relativamente ao controlo, o que representa um aumento dos fenólicos totais de aproximadamente 57% (Figura 13).

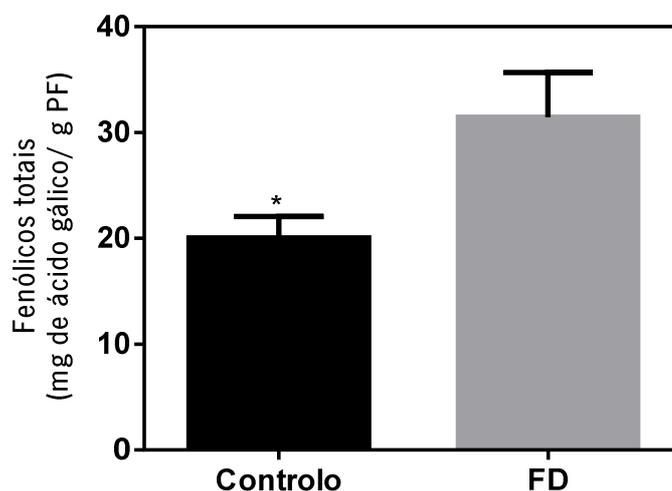


Figura 13. Resultados da quantificação dos fenólicos totais presentes nas amostras de videira com FD em comparação com os presentes na videira controlo. A absorvância das amostras foi medida no espectrofotómetro a 750 nm. As concentrações dos fenólicos foram determinadas usando a curva de calibração do ácido gálico [EAG].

Os polifenóis são um grupo de metabolitos secundários importantes que desempenham um papel essencial na determinação de características de qualidade da uva e do vinho, (Chamkha

et al., 2003). Além disso, estão envolvidos no desenvolvimento de plantas resistentes a uma série de estresses bióticos e abióticos (Dixon e Paiva, 1995).

Aumentos no conteúdo de compostos fenólicos foram descritos em maçã e ameixa infetados com fitoplasmas (Junqueira *et al.*, 2004), sugerindo que os compostos fenólicos podem estar envolvidos na defesa das plantas e os seus níveis de acumulação em resposta à infecção, podem estar relacionados com o nível de resistência do hospedeiro (Nicholson e Hammerschmidt, 1992).

Outro trabalho realizado com videiras cv. Barbera e Nebbiolo infetadas com FD mostraram um aumento sazonal na concentração de compostos fenólicos quando comparadas com videiras saudáveis, sendo também observadas diferenças no tempo de resposta às infeções e diferenças na concentração destes compostos nas duas variedades (Margaria *et al.*, 2013). No entanto, os autores concluíram que a acumulação dos compostos fenólicos nas folhas não influenciou a concentração do fitoplasma da FD, não excluindo desta forma a hipótese de que a sua acumulação possa estar envolvida no desenvolvimento da doença (Margaria *et al.*, 2014).

Outra explicação para o aumento do conteúdo em fenólicos totais prende-se com a maior quantidade de açúcares presentes na folha. Está bem descrito em videira que a síntese de compostos secundários é bem regulada pela presença de açúcares. Por exemplo, foi demonstrado que a acumulação de antocianinas nos discos foliares é estimulada pela sacarose, e culturas celulares de videira acumulam uma maior quantidade de antocianinas, estilbenos e polifenóis em geral quando tratadas com sacarose (Larronde *et al.*, 1998).

3.5. As varas atempadas de videiras cv. Loureiro infetadas acumulam níveis inferiores de amido

A videira, como planta perene, acumula carbono de reserva nas raízes e partes lenhosas durante o verão, por forma a sustentar o crescimento na primavera.

Neste ensaio foram usadas varas das videiras FD-2014, previamente postas a vernalizar a 4 °C durante 4 meses. As varas da planta com FD possuíam as extremidades não atempadas, no entanto, usamos apenas as partes atempadas, retiradas de vários locais diferentes ao longo da vara, como de várias varas diferentes da mesma planta, moídas juntas. Quando o teor de amido de plantas controlo e infetadas por FD foi avaliado, verificou-se uma diminuição nas canas de plantas infetadas de cerca de 23% ($p=0.048$) (Figura 14).

O amido é um polissacarídeo constituído por várias moléculas de glucose e trata-se do açúcar de reserva nas plantas. O amido tem sido reportado como um dos açúcares alterados após infeção com fitoplasmas. Estudos fisiológicos demonstraram que os níveis de amido nas raízes de árvores de fruto infetadas com fitoplasmas são reduzidos de cerca de metade a um terço do que nas plantas sãs, e que o amido e outros hidratos de carbono se acumulam nas folhas (Dickinson *et al.*, 2013). Também em plantas de tabaco e *C. roseus* infetados com fitoplasmas, se verificou o aumento em hidratos de carbono e amido nas folhas e uma redução nas raízes (Lepka *et al.*, 1999).

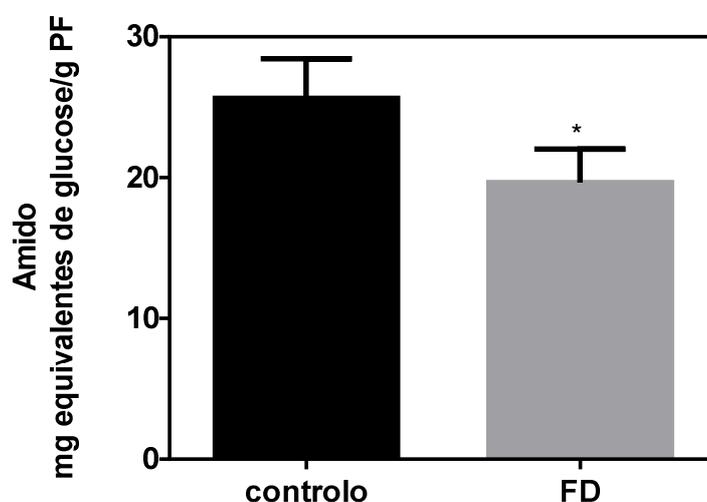


Figura 14. Resultados da quantificação do amido presente nas amostras de videiras com FD e controlo. A absorvância das amostras foi medida no espectrofotómetro a 540 nm. As concentrações dos açúcares redutores foram determinadas usando a curva de calibração da glucose (amido mg equivalentes de glucose/ g PF).

3.6. Em videiras cv. Loureiro infetadas ocorre reprogramação ao nível transcripcional de genes de transportadores de açúcares

As plantas são organismos autotróficos que, genericamente, assimilam o carbono atmosférico nas folhas e depois o distribuem pelos outros órgãos através do floema. Assim, os transportadores de açúcar exercem uma função central na acumulação de carbono nos tecidos heterotróficos como frutos, raízes, folhas jovens e canas (Chen *et al.*, 2010; Afoufa-Bastien *et al.*, 2010). Além disto, há evidências que durante a evolução de infeções provocadas por patogénicos biotróficos, os microrganismos desenvolveram mecanismos para regular os transportadores de açúcares direcionando-os de forma a sustentar o seu desenvolvimento (Frank Baker *et al.*, 2012). No entanto, há poucos resultados acerca da modificação nos transportadores de açúcar depois da infeção com FD, nesse sentido e como verificado anteriormente, a infeção por FD promove um

aumento da acumulação de açúcares reductores totais (Figura 10), da frutose (Figura 11) e sacarose (Figura 12) nas folhas, pelo que a expressão de genes *VvSWEET1*, *VvSUC12* e *VvSUC27*, envolvidos no transporte de açúcares, foi estudada. Como é possível observar na Figura 15, a expressão dos genes *VvSWEET1* e *VvSUC27* foi significativamente reduzida em plantas infetadas com FD.

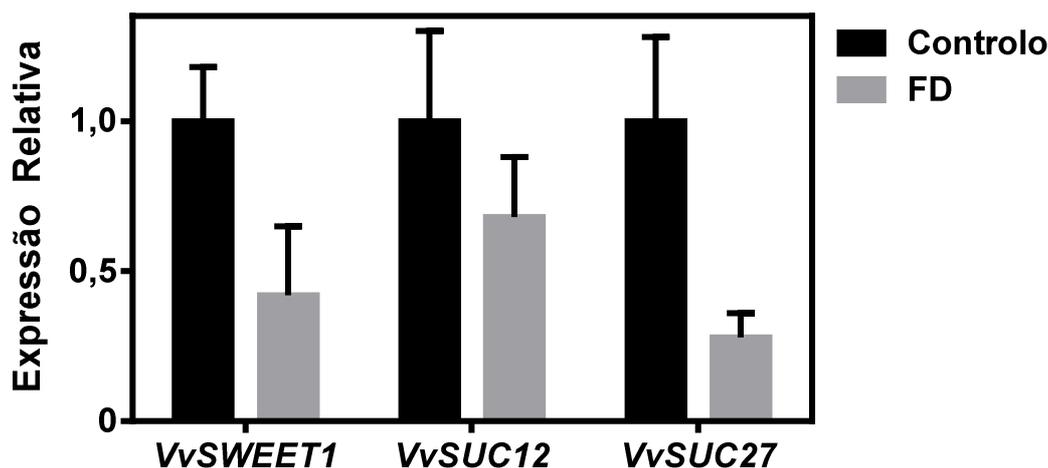


Figura 15. Resultados do PCR em tempo real para a expressão relativa de genes envolvidos no transporte de açúcares.

No caso do *VvSWEET1* verificou-se uma diminuição da expressão em plantas infetadas com FD. Esta diminuição é estatisticamente significativa ($p= 0,03$) representando uma perda de expressão de 58% comparativamente às plantas controlo (Figura 15).

Os transportadores *SWEET* pertencem a uma família de proteínas recentemente descrita e que são responsáveis pelo expor te de açúcares, apresentando baixa afinidade mas alta capacidade, desempenhando um importante papel na produção de néctar e no desenvolvimento de sementes e pólen (Chong *et al.*, 2014). O *Atsweet1* foi o primeiro a ser descrito em *Arabidopsis thaliana* e age como transportador unidirecional de glucose (Chen *et al.*, 2010). Foi descrito que estes genes são induzidos por agentes patogénicos e simbios tantes de forma a aumentarem a disponibilidade de açúcares para o patogénico (Chen *et al.*, 2010). Num estudo mais recente em videira, no qual foi avaliada a expressão dos genes da família *SWEET*, foi observado que o *VvSWEET1* é de todos o mais fortemente expresso em folhas jovens e adultas, e também que a sua expressão, em conjunto com a de outros *VvSWEETs*, é induzida quando as plantas são inoculadas com as bactérias indutoras de mildio e oídio (Chong *et al.*, 2014).

Relativamente ao *VvSUC12* verificou-se uma diminuição da expressão em plantas infetadas com FD. Esta diminuição não é, no entanto estatisticamente significativa ($p=0,20$) representando uma perda de expressão de 32% comparativamente às plantas saudáveis (Controlo) (Figura 15). Para o *VvSUC27* verificou-se uma diminuição da expressão em plantas infetadas com FD. Esta diminuição é estatisticamente significativa ($p=0,01$) revelando uma perda de expressão de 72% comparativamente às plantas controlo (Figura 15).

As proteínas SUC pertencem a uma família de transportadores de dissacarídeos responsáveis pelo transporte de sacarose para o floema e para tecidos heterotróficos. Em videira estão descritos três membros desta família de transportadores, o *VvSUC11*, *VvSUC12* e *VvSUC27*. O *VvSUC27* é expresso a um nível elevado em pecíolos, caules e gavinhas, sendo menos abundante em folhas jovens, folhas maduras e raízes (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010). Neste estudo, o *VvSUC27* foi o transportador com maior perda de expressão, o que pode dever-se ao facto de ser um transportador envolvido no carregamento da sacarose para o floema.

A diminuição da expressão de genes envolvidos no transporte de açúcares está de acordo com o aumento da quantidade de açúcares observada nas folhas de plantas infetadas com FD. Também, e apesar de termos identificado um menor teor em clorofilas totais, observou-se um aumento nos açúcares totais, facto que poderá estar ligado a um menor transporte de açúcar das folhas para os tecidos heterotróficos. Está descrito que patogénicos de plantas modulam a expressão de genes do hospedeiro de forma a obterem mais nutrientes para o seu desenvolvimento (Chen *et al.*, 2010). Apesar deste tipo de regulação ainda não ter sido descrita para infeções por FD, não pode ser posta de lado a hipótese da bactéria promover uma repressão de genes envolvidos no transporte de açúcares das folhas para os órgãos heterotróficos, como forma de aumentar a concentração de hidratos de carbono nas folhas para seu próprio benefício.

3.7. Em videiras cv. Loureiro infetadas ocorre reprogramação ao nível transcripcional de enzimas do metabolismo secundário

Os fenilpropanóides são uma família diversa de compostos fenólicos, cuja via leva à produção de um grande número de metabolitos derivados de fenilalanina, tal como flavonóis, proantocianidinas e isoflavonas (Bohm, 1998). A via fenilpropanóide inicia-se com uma reação catalisada pela fenilalanina amónia-liase (PAL), em que a fenilalanina sofre uma desaminação. Em seguida, diferentes enzimas atuam sequencialmente, a fim de formar as diferentes classes de produtos. Entre estes produtos estão, os flavonóis e antocianinas, cuja produção é altamente

dependente da atividade catalítica da flavonol sintetase (FLS) e UDP-Glu: flavonóide-3-O-glucosiltransferase (UFGT), respetivamente (Davies e Schwinn, 2003).

Considerando o aumento no teor em compostos fenólicos observado em plantas infetadas com FD, a expressão dos genes *VvFLS*, *VvUFGT* e *VvPAL* foi estudada. Apesar do aumento de cerca de 57% nos compostos fenólicos totais (Figura 13), verificou-se que a expressão dos genes *VvUFGT* e *VvPAL* quase não se alterou, e que a expressão do gene *VvFLS* diminuiu cerca de 50% (Figura 16).

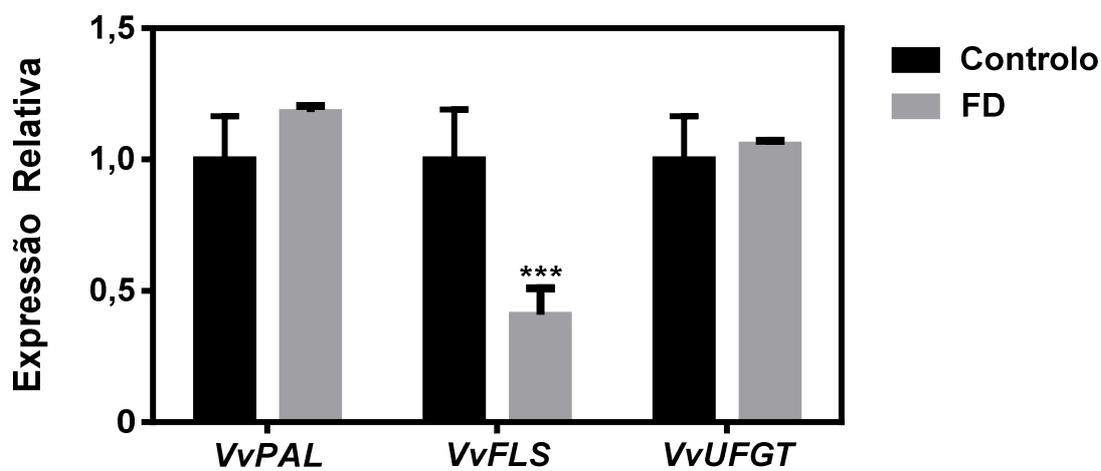


Figura 16. Resultados obtidos por PCR em tempo real da expressão génica relativa de genes envolvidos no metabolismo secundário de *Vitis vinifera*.

No caso da *VvPAL*, verificou-se um aumento da expressão em plantas infetadas com FD. Esta diminuição não é estatisticamente significativa ($p=0,13$) representando um aumento de expressão de 18% comparativamente às plantas controlo (Figura 16).

A PAL é a enzima considerada o ponto de divisão entre o metabolismo primário e secundário (Dixon e Paiva, 1995), convertendo L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, precursor de vários fenilpropanóides como legnina, cumarina, ácidos fenólicos e flavonóides (Wen *et al.*, 2005), e sabe-se que em videira a sua expressão é induzida por vários stresses bióticos e abióticos, o que resulta na acumulação de compostos fenólicos como, ácidos fenólicos e flavonóides (Downey *et al.*, 2003).

Num estudo realizado com a cv. Chardonnay, foi observado que a expressão de genes da via de síntese dos fenilpropanóides, entre os quais, a *VvPAL*, foi reprimida quando as videiras estavam infetadas com o fitoplasma Bois Noir, indicando um bloqueio na biossíntese de legnina e

uma maior suscetibilidade à infecção (Dixon *et al.*, 2002). No entanto, outros estudos relatam um aumento da expressão da *PAL* em milho com ferimentos, embora mais notória que em milho infetado com fungos, mas nos dois casos houve um aumento da biossíntese de compostos fenólicos (Nicholson e Hammerschmidt, 1992). Noutros trabalhos realizados em videira os resultados mostraram uma forte indução da *VvPAL* na presença dos fungos *B. cineria*, *P. syringae* pv. *pisi* e *P. viticola*, o que dá a ideia que a indução da *VvPAL* seguida da produção de fitoalexinas poderá ser uma resposta comum da videira à infecção por patogénicos (Chong *et al.*, 2008). Os resultados do presente trabalho sugerem que o aumento da expressão da *VvPAL* pode estar relacionado com o aumento dos compostos fenólicos como forma de modular a resistência à infecção.

O *FLS* é o gene que codifica a enzima de conversão biossintética de dihidroflavonóis em flavonóis (Spribille e Forkmann, 1984). Em estudos anteriores, os compostos fenólicos dos quais os flavonóis fazem parte apareciam aumentados significativamente nas plantas infetadas com FD, no entanto, *VvFLS* aparece com expressão diminuída nas plantas infetadas, o que pode sugerir que os compostos fenólicos que estão aumentados nas plantas infetadas com FD poderão não ser os flavonóis e sim, outros, tais como: lenhina, ácidos fenólicos e estilbenos.

Para o *VvFLS* verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,02$) da expressão, em plantas infetadas com FD, representando uma perda de expressão de 59% comparativamente às plantas saudáveis (Controlo) (Figura 16).

Num ensaio realizado com *Vitis vinifera* L. cv Shiraz, foi demonstrado que os genes *VvFLS1* aparecem expressos logo nos primeiros estágios de desenvolvimento das folhas, e vão aumentando ao longo da temporada. Estes mesmos autores referem que o nível de expressão de *VvFLS* está relacionada com os altos níveis de flavonóis presentes nas folhas (Downey *et al.*, 2003).

Mais recentemente, foi realizado um estudo de análise metabólica e transcriptómica em *Vitis vinifera* cv. Barbera e cv. Nebbiolo no qual foi concluído que não existe nenhuma correlação significativa entre a expressão de *VvFLS* e a concentração de flavonóis, e que, portanto, a infecção com FD não afeta a acumulação destes compostos secundários (Margaria *et al.*, 2014).

Para o *VvUFGT* verificou-se um aumento da expressão em plantas infetadas com FD de 5,7% comparativamente às plantas controlo, estatisticamente não significativo ($p=0,58$) (Figura 16). A enzima UFGT em *Vitis vinifera* desempenha um papel de controlo na síntese de antocianinas, estando fortemente relacionada com o conteúdo de antocianinas que aparecem na fase do pintor (Ford *et al.*, 1998). Em estudos realizados com cv. Shiraz, foi demonstrado que a

expressão do gene *VvUFGT* apenas foi detetado nos bagos de uvas tintas, onde as antocianinas estão presentes (Kobayashi *et al.*, 2001). Outros autores afirmam também que a *VvUFGT* apenas é expresso nos tecidos dos frutos (Grimplet *et al.*, 2007; Niu *et al.*, 2010) No entanto, este resultado não vai de encontro ao obtido no ensaio realizado no presente trabalho, em que o *VvUFGT* não só foi detetado nas folhas da cv. Loureiro branco como também sofreu um ligeiro aumento, embora não significativo, nas folhas com FD.

3.8. Em estacas lenhosas enraizadas de videiras cv. Loureiro contaminadas não foi detetada a infeção por FD

No presente ensaio pretendeu-se obter em laboratório plantas contaminadas com FD e videiras saudáveis, obtendo as estacas das varas recolhidas em novembro de 2014 que estiveram acondicionadas a 4 °C durante 4 meses. As varas selecionadas para estacas foram seccionadas e foram usadas as partes basais e médias na maioria, mas também algumas apicais que se encontravam mal atempadas.

A técnica utilizada foi a propagação vegetativa ou assexuada, técnica que possibilita obter plantas clone da planta mãe, permitindo assim obter um grande número de plantas com características genéticas iguais entre si, o que aumentaria a fiabilidade dos ensaios realizados.

A Tabela 7, mostra o esquema de acontecimentos desde a recolha em campo até ao momento da recolha do material plantado em laboratório.

Tabela 7. Esquema cronológico da propagação vegetativa das videiras para análise por PCR em tempo real para diagnóstico de Flavescência Dourada.

Novembro de 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Recolha das varas em campo • Armazenamento a 4 °C
Fevereiro de 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Fim da vernalização • Tratamento das estacas com IBA 1mg / ml • Propagação vegetativa em câmara de cultura com ciclo de luz de 16 h a 24 °C
Março de 2015	<ul style="list-style-type: none"> • As estacas estavam no estado de brotação
Abril de 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Recolha de folhas, pecíolos, nervuras e raízes para diagnóstico de FD por PCR em tempo real

Em março as videiras encontravam-se na fase de brotação, que constitui o despertar fenológico da videira após a dormência invernal e ocorre com base nos nutrientes acumulados pela planta no ano anterior. Em abril, altura da recolha, as videiras estavam desenvolvidas como mostra a Figura 14.

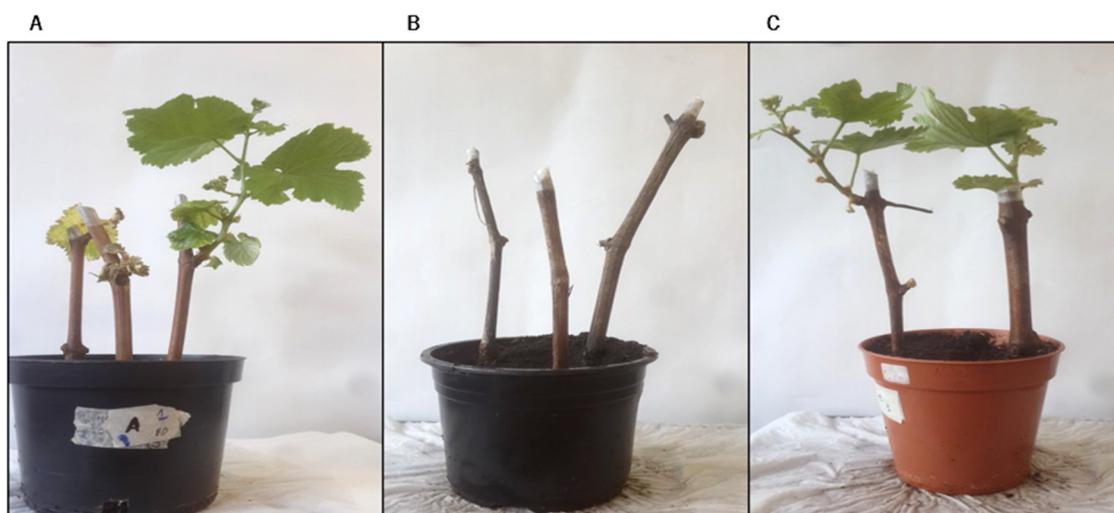


Figura 17. Estacas obtidas por regeneração de varas de videira: A: Planta com FD (varas atempadas); B: Planta com FD (varas não atempadas); C: Planta saudável (controlo).

Como resultado da propagação vegetativa, obtivemos a regeneração de 33,3% de plantas com FD, das estacas que estavam atempadas, 0% de regeneração das estacas não atempadas e 60% de estacas regeneradas da planta controlo. Foram recolhidas de cada uma das plantas obtidas por propagação vegetativa: folhas, pecíolos e raízes, com o objetivo de detetar FD por PCR em tempo real.

Os resultados do PCR em tempo real mostraram que utilizando esta estratégia foi impossível detetar a infeção por FD nos diversos tecidos, apesar de nas plantas regeneradas de videiras contaminadas com FD apresentarem um crescimento mais tardio e menos desenvolvimento relativamente às plantas saudáveis (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados do PCR em tempo real da detecção de fitoplasmas nos vários tecidos vegetais de uma videira saudável e outra com FD. *Primer UNI*: *primer* universal para fitoplasmas; *Primer FD*: *primer* para detecção de Flavescência Dourada; *PrimerVvGPT*: *primer* para amplificação de um gene constitutivo da videira (Controlo interno).

Material Vegetal	<i>Primer</i>UNI	<i>Primer</i> FD	<i>Primer</i>GPT
Pecíolos FD	-	-	+
Folhas FD	-	-	+
Raízes FD	-	-	+
Pecíolos Controlo	-	-	+
Folhas Controlo	-	-	+
Raízes Controlo	-	-	+

Esta ausência de detecção da doença em plantas regeneradas não possui uma explicação fácil, mas é possível avançar que a doença pode não ter sobrevivido à baixa temperatura de armazenamento. No entanto, apenas foi demonstrado que expor as varas de plantas contaminadas a banhos de 50 °C por 45 min é capaz de eliminar o fitoplasma do material vegetativo (Europe, 2012). Por outro lado, esta ausência de detecção pode dever-se ao facto dos tecidos da videira serem demasiado jovens e o fitoplasma ainda não ter estado sujeito às condições ideais para se multiplicar. Outra hipótese que é possível avançar é a possibilidade de recuperação (remissão espontânea dos sintomas) da FD mediada pela acumulação a longo prazo de espécies reativas de oxigénio (ROS) como H₂O₂ no floema. Este mecanismo não altera os outros sistemas antioxidantes e não representa risco para a planta (Musetti *et al.*, 2007).

A recuperação também pode estar associada ao desaparecimento do fitoplasma pois a planta não foi novamente infetada durante um período considerável (Belli *et al.*, 2010), bem como o crescimento de endófitos bacterianos ou fúngicos da videira que poderiam estar nas varas originalmente recolhidas (Martini *et al.*, 2009; Belli *et al.*, 2010).

Apesar do mecanismo da recuperação das plantas infetadas por FD ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que plantas que apresentam sintomas mais severos, também são as que apresentam maior capacidade de recuperação da infeção por FD (Vitali *et al.*, 2013), sendo a recuperação altamente influenciada pelos genótipos dos organismos patogénicos e hospedeiros (Morone *et al.*, 2007), e é razoável considerar que as interações entre o patogénico, o hospedeiro e o ambiente desempenham um papel fundamental no fenómeno de recuperação (Belli *et al.*, 2010).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em conclusão, os protocolos de PCR em tempo real otimizados representam um procedimento rápido, sensível e específico para o diagnóstico de rotina de fitoplasmas na casta Loureiro. Para reforçar a fiabilidade do método de diagnóstico recomenda-se a utilização de *primers* Universais e de *primers* específicos para a deteção BN e de FD.

Ao nível bioquímico, foi possível verificar que o fitoplasma *Ca. Phytoplasma Vitis* induz alterações no seu hospedeiro, como a redução do conteúdo em clorofilas das folhas e o aumento dos níveis de açúcar, incluindo de frutose e de sacarose, que poderão ser mobilizados para o crescimento do parasita. Os compostos fenólicos também aumentaram significativamente em folhas de plantas sintomáticas, eventualmente como mecanismo de resposta do hospedeiro à infeção ou devido ao aumento observado do conteúdo em açúcares que estimula o metabolismo secundário.

A infeção pelo parasita induziu ainda uma diminuição significativa do teor de amido acumulado nas varas no final da estação, comprometendo o seu atempamento, possivelmente devido ao desvio dos fotoassimilados para o crescimento do parasita.

Ao nível molecular, os resultados sugerem que o parasita intracelular é capaz induzir a repressão de genes envolvidos no carregamento de açúcares ao nível do floema, o que pode estar relacionado com o aumento observado dos níveis de açúcares nas folhas e com a redução dos níveis de amido nas varas das plantas infetadas. Com efeito, a expressão dos genes *VvSWEET1*, *VvSUC12* e *VvSUC27* foi reprimida em plantas sintomáticas, como forma de aumentar a concentração de hidratos de carbono nas folhas para seu próprio benefício.

A expressão dos genes *VvFLS*, *VvUFGT* e *VvPAL* foi estudada depois de se observar um aumento do teor em compostos fenólicos (57%) em folhas de plantas sintomáticas. Enquanto a expressão dos genes *VvUFGT* e *VvPAL* sofreu um ligeiro aumento, os níveis de transcritos do gene *VvFLS* diminuí significativamente. A redução da expressão do *VvFLS* pode sugerir que compostos secundários com a lenhina, os ácidos fenólicos e os estilbenos podem ter contribuído para o aumento observado do teor em fenólicos totais em folhas de plantas sintomáticas. No entanto, este tema merece uma atenção especial em estudos futuros.

Relativamente aos estudos em estacas enraizadas de varas provenientes de videiras sintomáticas, os resultados mostraram que em nenhum dos tecidos analisados (nervuras de folhas, pecíolos e raízes) se obteve um diagnóstico positivo de infeção, pelo que o estacamento que se poderá afigurar como uma estratégia eficiente para a propagação de material vegetativo

saudável. Estas experiências que mostraram uma remissão espontânea dos sintomas de infecção requerem, contudo, maior atenção em estudos futuros.

O estudo bioquímico e molecular das alterações induzidas pelo fitoplasma da Flavescência Dourada pode dar indicações valiosas sobre os mecanismos de desenvolvimento da doença, bem como abrir novas pistas para a otimização de métodos de diagnóstico. Estudos futuros poderão envolver ensaios com material proveniente de plantas sintomáticas cultivadas em estufa no sentido de ser possível estudar com rigor ao longo da estação as manifestações da doença, bem como os mecanismos moleculares envolvidos. Como referido, em condições de campo as plantas sintomáticas têm obrigatoriamente que ser abatidas, o que limita fortemente a execução do trabalho experimental. O estudo da doença em outras castas com diferentes suscetibilidades também se afigura como um objetivo importante para estudos futuros, podendo abrir pistas para o controlo mais eficiente da infecção.

5. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- Abbà, S., Galetto, L., Carle, P., Carrère, S., Delledonne, M., Foissac, X., Palmano, S., Veratti, F., Marzachi, C., 2014. RNA-Seq profile of flavescente dorée phytoplasma in grapevine. *BMC Genomics* 15, 1088.
- Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R., Laloi, M., 2010. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biol.* 10, 245.
- Ahrens, U., Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of Plant Pathogenic Mycoplasma-like Organisms by a Polymerase Chain Reaction that Amplifies a Sequence of the 16S rRNA Gene. *Phytopathology* 82, 828–832.
- Andrade, N.M., Arismendi, N.L., 2013. Phytoplasma. pp. 115–121. doi:10.1007/978-1-62703-089-2
- Andrade, R., Baltazar, C., Cantus, JM., Carvalho, P., Cavaco, M., Chicau, G., Garrido, J., López, JM., Moratiel, R., Pedras, J., Sousa, E., Teixeira, K., Vila Maior, J., Sapeç Agro., 2014. Flavesçência Dourada, *Scaphoideus titanus*. *Cadernos Técnicos.* 3, 38.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., Boudon-Padieu, E., 2001. Flavescente dorée in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40, 79–86.
- Angelini, E., Luca Bianchi, G., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo, M., 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* 68, 613–622.

- Aradhya, M.K., Dangl, G.S., Prins, B.H., Boursiquot, J.-M., Walker, M.A., Meredith, C.P., Simon, C.J., 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genet. Res.* 81. doi:10.1017/S0016672303006177
- Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R., Carrillo, R., 2010. Presence of a phytoplasma associated with witches ' broom disease in *Ugni molinae* Turcz and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI , PCR , and DNA sequencing. *Chil J Agr Res* 70, 26–33.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Soylemezoglu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibanez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikiriou, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F., Martinez-Zapater, J.M., 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol Ecol* 15, 3707–3714.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D. V, Walunas, T., Lapidus, A., John, W., Hogenhout, S.A., Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D. V, Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A., 2006. Living with Genome Instability : the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts Living with Genome Instability : the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. 188, 3682–3696. doi:10.1128/JB.188.10.3682
- Belli G., Fortusini A., Osler R., Amici A., 1973. Presenza di una malattia del tipo “Flavescence dorée” in vigneti dell’Oltrepò pavese. *Rivista di Patologia Vegetale Ser. IV* 9 (Suppl.): 50- 56.
- Belli, G., Bianco, P. a., Conti, M., 2010. Grapevine yellows in Italy: Past, present and future. *J. Plant Pathol.* 92, 303–326.

- Bertamini, M., Grando, M.S., Nedunchezian, N., 2003. Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll-protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. *Biol. Plant.* doi:10.1023/B:BIOP.0000022258.49957.9a
- Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F., Grando, M., 2002. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61, 357–366.
- Bianco, P. a., Casati, P., Marziliano, N., 2004. Detection of phytoplasmas associated with grapevine flavescence dorée disease using real-time PCR. *J. Plant Pathol.* 86, 257–261.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., Soustre-Gacougnolle, I., 2013. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biol.* 13, 31.
- Boudon-Padieu, E., Foissac, X., 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 73. doi:10.1128/AEM.02323-06.
- Boudon-Padieu, E., Béjat, A., Clair, D., Larrue, J., Borgo, M., Bertotto, L., Angelini, E., 2003. Grapevine yellows: Comparison of different procedures for DNA extraction and amplification with PCR for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis* 42, 141–149.
- Caudwell A., 1957. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales d'Amélioration des Plantes* 12: 359-393.
- Caudwell A., Larrue J., Valat C., Grenan S., 1990.- Les traitements à l'eau chaude des bois de vigne atteints de la "flavescence dorée". *Progrès Agricole et Viticole*, 107 (12): 281-286.

- Carle, P., Malembic-Maher, S., Arricau-Bouvery, N., Desqué, D., Eveillard, S., Carrère, S., Foissac, X., 2011. "Flavescence dorée" phytoplasma genome: A metabolism oriented towards glycolysis and protein degradation. *Bull. Insectology* 64, 13–14.
- Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., Douillard, R., 2003. Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3179–3184. doi:10.1021/jf021105j.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B., 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532.
- Chong, J., Le Henanff, G., Bertsch, C., Walter, B., 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 469–481.
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., Mestre, P., 2014. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 65, 6589–6601. doi:10.1093/jxb/eru375.
- Chuche, J., Thiéry, D., 2014. Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 381–403.
- Daire, X.; Boudon-Padieu, E.; Berville, A.; Schneider, B.; Caudwell, A., 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology* 121, 95-103.
- Davis, R.E., Dally, E.L., 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Dis.* 85, 790–797.

- Davies, K.M., Schwinn, K.E., 2003. Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct. Plant Biol.* 30, 913. doi:10.1071/FP03062.
- Delrot, S., Medrano, H., Or, E., Bavaresco, L., Grando, S., 2010. *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Springer, 448 pp.
- Devonshire, B.J., 2013. *Phytoplasma*. pp. 123–138. doi:10.1007/978-1-62703-089-2 DGAV, 2013. Plano de ação nacional para o controlo da flavescência dourada da videira. Dickinson, M., Tuffen, M., Hodgetts, J., 2013. *Phytoplasma*. pp. 1–14. doi:10.1007/978-1-62703-089-2
- Dixon, R. a., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S., Wang, L., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3, 371–390.
- Dixon, R., Paiva, N., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyaam H., 1967. Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or Paulownia witches broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson, S.P., 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 9, 110–121.
- Europe, O., 2012. Hot water treatment of grapevine to control Grapevine flavescence dorée phytoplasma. *EPP0 Bull.* 42, 490–492.
- Eweldt, G., Possingham, J.A., 1988. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.* 75, 669–673.

- Ford, C.M., Boss, P.K., Høj, P.B., 1998. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose. Flavonoid 3- O-Glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze- 1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 9224–9233. doi:10.1074/jbc.273.15.9224
- Frank Baker, R., Leach, K.A., Braun, D.M., 2012. SWEET as sugar: New sucrose effluxers in plants. *Mol. Plant* 5, 766–768.
- Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C., 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescence doree (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Ann. Appl. Biol.* 147, 191–201.
- Gambino, G., Boccacci, P., Margaria, P., Palmano, S., Gribaudo, I., 2013. Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from flavescence dorée disease. *Phytopathology* 103, 776–84.
- Green, M.J., Thompson, D. a., MacKenzie, D.J., 1999. Easy and Efficient DNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Phytoplasmas by Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 83, 482–485.
- Grimplet, J., Deluc, L.G., Tillett, R.L., Wheatley, M.D., Schlauch, K. a, Cramer, G.R., Cushman, J.C., 2007. Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8, 187.
- Harrison, N.A., Davis, R.E., Helmick, E.E., Marzachi, C., Palermo, S., Boarino, A., Veratti, F., D'Aquilio, M., Loria, A., Boccardo, G., Sheets, D., Pests, Q., Green, M.J., Thompson, D. a., MacKenzie, D.J., Codina, 2013. Phytoplasma. *EPPD Bull.* 37, 482–485.
- Hogenhout, S. a., Oshima, K., Ammar, E.D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., Namba, S., 2008. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9, 403–423.

- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnikar, M., 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.* 56, 785–796.
- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., Gruden, K., 2009. “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10, 460.
- Hren, M., Ravnikar, M., Brzin, J., Ermacora, P., Carraro, L., Bianco, P.A., Casati, P., Borgo, M., Angelini, E., Rotter, A., Gruden, K., 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathol.* 58 (1), 170–180.
- Ji, X., Gai, Y., Zheng, C., Mu, Z., 2009. Comparative proteomic analysis provides new insights into mulberry dwarf responses in mulberry (*Morus alba* L.). *Proteomics* 9, 5328–39.
- Junqueira, A., Bedendo, I., Pascholati, S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 181–185.
- Kirkpatrick, B., Stenger, D. C., Morris, T. J., Purcell, A.H., 1987. Cloning and detection of DNA from a monoculturable plant pathogenic mycoplasma- Like Organism. *Science* 238: 197-200.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C.K., Yakushiji, H., Goto, N., 2001. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* 160, 543–550.
- Kogovšek, P., Hodgetts, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., Lenarčič, R., Rotter, A., Dickinson, M., Boonham, N., Dermastia, M., Ravnikar, M., 2015. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathol.* 64, 286–296.

- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., Mérillon, J.M., 1998. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep.* 17, 946–950.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., Seemüller, E., 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 59–68.
- Maggi, F., Marzachi, C., Bosco, D., 2013. A stage-structured model of *Scaphoideus titanus* in vineyards. *Environ. Entomol.* 42, 181–193.
- Malembic-Maher, S., Constable, F., Cimerman, A., Arnaud, G., Carle, P., Foissac, X., Elisabeth Boudon-Padieu, 2007. Progress towards a chromosome map of the “flavescence dorée” phytoplasma. *Bull. Insectology* 60, 117–118.
- Mannini, F., 2007. Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infections. *Bull. Insectology* 60, 311–312.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, a, Lauer, U., Seemüller, E., 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805–810.
- Margaria, P., Abbà, S., Palmano, S., 2013. Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. *BMC Genomics* 14, 38.
- Margaria, P., Ferrandino, A., Caciagli, P., Kedrina, O., Schubert, A., Palmano, S., 2014. Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera*L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, Cell Environ.* 37, 2183–2200.

- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., Osler, R., 2009. DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* 93, 993–998.
- Marzachi, C., Palermo, S., Boarino, A., Veratti, F., D'Aquilio, M., Loria, A., Boccoardo, G., 2001. Optimisation of a one-step PCR assay for the diagnosis of Flavescence dorée-related phytoplasmas in field-grown grapevines and vector populations. *Vitis* 40, 213–217.
- Mehle, N., Prezelj, N., Hren, M., Boben, J., Gruden, K., Ravnkar, M., Dermastia, M., 2013. *Phytoplasma*. doi:10.1007/978-1-62703-089-2
- Mesquita M., M., 2013. Distribuição da Flavescência dourada e do vetor na Região Norte. (DRAPN).
- Mori, N., Bressan, A., Martini, M., Guadagnini, M., Girolami, V., Bertaccini, A., 2002. Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée-type phytoplasmas. *Vitis* 41, 99–102
- Morone, C., Boveri, M., Giosuè, S., Gotta, P., Rossi, V., Scapin, I., Marzachi, C., 2007. Epidemiology of flavescence dorée in vineyards in northwestern Italy. *Phytopathology* 97, 1422–7.
- Musetti, R., Marabottini, R., Badiani, M., Martini, M., Sanità Di Toppi, L., Borselli, S., Borgo, M., Osler, R., 2007. On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Funct. Plant Biol.* 34, 750–758.
- Niu, S.S., Xu, C.J., Zhang, W.S., Zhang, B., Li, X., Lin-Wang, K., Ferguson, I.B., Allan, A.C., Chen, K.S., 2010. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor. *Planta* 231, 887–899.
- Noronha, H., Conde, C., Delrot, S., Gerós, H., 2015. Identification and functional characterization of grapevine transporters that mediate glucose-6-phosphate uptake into plastids. *Planta* 242, 909–920.

- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma., *Nature genetics*. doi:10.1038/ng1277
- Pastenes, C., Villalobos, L., R??os, N., Reyes, F., Turgeon, R., Franck, N., 2014. Carbon partitioning to berries in water stressed grapevines: The role of active transport in leaves and fruits. *Environ. Exp. Bot.* 107, 154–166.
- Prince, J.P., 1993. Molecular Detection of Diverse Mycoplasmalike Organisms (MLOs) Associated with Grapevine Yellows and Their Classification with Aster Yellows, X-Disease, and Elm Yellows MLOs. *Phytopathology* 83. 1130
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094–1156.
- Spribille, R., Forkmann, G., 1984. Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana*. *Zeitschrift Fuer Naturforsch. Sect. C Biosci.* 39, 714–719.
- Vegetal, L.D.S., Catalunya, G. De, Circulaci3, V., 2004. Grapevine yellows diseases in Spain : eight year survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved by 62, 127–133.
- Vid, D., Actuales, P., 2001. El cultivo de la Vid. *Perspectivas Actuales. Vitis* 1–32
- Vitali, M., Chitarra, W., Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C., Gullino, M.L., Spanna, F., Lovisolo, C., 2013. Flavescence dorée phytoplasma deregulates stomatal control of photosynthesis in *Vitis vinifera*. *Ann. Appl. Biol.* 162, 335–346.
- Vivier, M. a., Pretorius, I.S., 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotechnol.* 20, 472–478.

Waterhouse, L., 2002. Determination of Total Phenolics. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 1–8.

Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313.

Wen, P.-F., Chen, J.-Y., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Wan, S.-B., Huang, W.-D., 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci.* 169, 928–934.