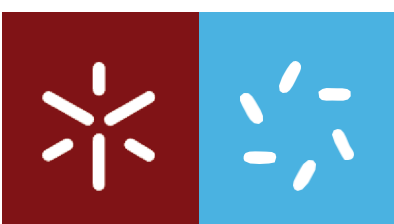




Infeção da videira por flavescência dourada – Estudos bioquímicos e moleculares em folhas da variedade Loureiro

Telmo Costa Cruz

UMinho | 2020



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Telmo Costa Cruz

Infeção da videira por flavescência dourada –
Estudos bioquímicos e moleculares em folhas da
variedade Loureiro

Janeiro de 2020



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Telmo Costa Cruz

Infeção da videira por flavescência dourada –
Estudos bioquímicos e moleculares em folhas
da variedade Loureiro

Dissertação de Mestrado
Biologia Molecular, Biotecnologia
e Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob orientação do
Doutor António Teixeira
e da
Doutora Viviana Martins

Janeiro 2020

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho:



Atribuição - Não Comercial - Compartilha Igual

CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Agradecimentos

Quero prestar um sincero agradecimento a todos que contribuíram para o meu percurso académico que até à data resultou na elaboração desta tese de mestrado.

Agradeço todo o apoio dado pelo Doutor António e pela Doutora Viviana que aceitaram ser meus orientadores. Eles guiaram-me durante este último ano e meio e com eles ouvi, refleti e aprendi, percebi também que com trabalho consegue-se tudo.

Um agradecimento especial ao Professor Hernâni que com toda a sua experiência sempre teve uma palavra para me aconselhar.

A todos os colegas do laboratório um obrigado pelo fantástico ambiente.

Aos meus pais, porque sem eles nada disto era possível, em particular à minha mãe por me “aturar” todos os dias. Aos meus avós e tias que estão sempre presentes e a toda a minha família.

À minha Martinha que está sempre comigo.

Aos meus amigos, os de sempre e os que fiz nesta universidade, um abraço.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis, Fernando Pessoa, 1933

Apoio Financeiro

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e Fundos Europeus (FEDER/POCI /COMPETE2020) – Projeto “BerryPlastid – Biosynthesis of secondary compounds in the grape berry: unlocking the role of the plastid” (POCI-01-0145-FEDER-028165 and PTDC/BIA-FBT/28165/2017)

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Infeção da videira por flavescência dourada – Estudos bioquímicos e moleculares em folhas da variedade Loureiro

Resumo

A flavescência dourada é uma doença da videira, causada pelo fitoplasma *Candidatus phytoplasma vitis*, propagado pelo vetor *Scaphoideus titanus*. Atualmente encontra-se disseminada pela maioria das regiões vitivinícolas da Europa. Em Portugal foi detetada pela primeira vez em 2007 na Região Demarcada dos “Vinhos Verdes” (DOC VV). Os sintomas mais visíveis da infeção consistem no atraso ou ausência do abrolhamento, crescimento reduzido e redução da quantidade dos gomos florais e consequente elevada perda de produtividade. Diferentes estudos apontam para alterações substanciais no metabolismo primário e secundário em videiras infetadas, incluindo a redução das clorofilas e a consequente diminuição da taxa fotossintética, acumulação nas folhas de açúcares e de compostos fenólicos, no entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nestas alterações metabólicas ainda são pouco conhecidos. Este estudo teve como principal objectivo a avaliação dos efeitos da flavescência dourada em folhas de videira ao nível molecular e bioquímico, nomeadamente i) no metabolismo dos principais açúcares e expressão de genes transportadores envolvidos no seu efluxo, ii) na síntese de pigmentos fotossintéticos como as clorofilas *a*, *b* e carotenoides totais e expressão de genes envolvidos na sua síntese e iii) em compostos-chave do metabolismo secundário e expressão de genes envolvidos nas principais vias da sua biossíntese. Para o efeito, foi selecionada a variedade Loureiro de uma vinha comercial localizada na região dos Vinhos Verdes, com plantas previamente diagnosticadas com infeção por FD. Foram colhidas folhas com sintomas aparentes de infeção e folhas saudáveis (controlo) em dois períodos do desenvolvimento vegetativo (E-L 33 e E-L 38). Testes de detecção da doença por PCR em tempo real permitiram confirmar a infeção por FD apenas nas folhas de videiras sintomáticas. Nestas folhas, verificou-se um forte decréscimo do conteúdo em clorofilas *a* e *b* bem como do número de transcritos dos genes *VvGGPPS11*, *VvGGR* e *VvCHLSYN* envolvidos na sua biossíntese. Em sentido oposto, folhas infetadas acumularam maior quantidade de açúcares redutores e sacarose, e foi observada uma redução da expressão de genes da membrana plastidial envolvidos na importação/exportação de açúcares incluindo o *VvSWEET1*, *VvpGT1* e *VvpGT2*, *VvGPT*, *VvMEX* e gene *VvNTT1* que codifica o antiportador de ATP com ADP da membrana plastidial. Por outro lado, em resposta à infeção, ocorreu um aumento da concentração de fenólicos totais, ácidos hidroxicinâmicos flavonóis e flavan-3-ols, particularmente em folhas de plantas na fase madura. No entanto, a expressão de alguns genes chave envolvidos na síntese destes metabolitos, como o *VvPAL* e *VvSTS*, não sofreu alterações significativas. Foi ainda observado que a redução das clorofilas poderá ser controlada a nível transcricional. O estudo bioquímico e molecular das alterações induzidas pelo fitoplasma da flavescência dourada permitiu compreender mais detalhadamente a redução do conteúdo em clorofilas e consequente o amarelecimento das folhas de videiras da variedade Loureiro, bem como alguns dos mecanismos moleculares de resposta à infeção.

Palavras-chave: clorofilas, flavescência dourada, *Vitis vinifera*, *VvCHLSYN*, *VvGGPPS11*

Grapevine infection by flavescence dorée – Molecular and biochemical studies in cv. Loureiro leaves

Abstract

Flavescence dorée is a vine disease, caused by the phytoplasma *Candidatus phytoplasma vitis*, propagated by the vector *Scaphoideus titanus*. It's now widespread in most wine regions in Europe. In Portugal, it was detected in 2007 in the Demarcated Region of “Vinhos Verdes” (DOC VV). The most visible symptoms of the infection consist of delayed or absent budbreak, reduced growth and reduced quantity of floral buds and consequent high loss of production. Different studies point to substantial changes in primary and secondary metabolism in infected vines, including the reduction of chlorophylls and the consequent decrease in photosynthetic rate, accumulation of sugars and phenolic compounds in the leaves, however, the molecular mechanisms involved in these metabolic changes are still poorly studied. The main objective of this study was the evaluation of the effects of FD on vine leaves at the molecular and biochemical level, namely i) on the metabolism of the main sugars and expression of transporter genes involved in their efflux, ii) on the synthesis of photosynthetic pigments such as chlorophylls *a*, *b* and total carotenoids and expression of genes involved in their synthesis, and iii) in key compounds of secondary metabolism and expression of genes involved in the main pathways of their biosynthesis. For this purpose, the Loureiro variety from a commercial vineyard located in the DOC region “Vinhos Verdes” was selected, with plants previously diagnosed with FD infection. Leaves with apparent symptoms of infection and healthy leaves (control) were collected in two periods of vegetative development (E-L 33 and E-L 38). Tests for detection of the disease by real-time PCR confirmed the FD infection only in symptomatic grape leaves. In these leaves, there was a strong decrease in the content of chlorophylls *a* and *b* as well as in the number of transcripts of the *VvGGPPS11*, *VvGGR* and *VvCHLSYN* genes involved in their biosynthesis. Conversely, infected leaves accumulated a greater amount of reducing sugars and sucrose, and a reduction in the expression of plastidial membrane genes involved in the import / export of sugars was observed, including *VvSWEET1*, *VvpGT1* and *VvpGT2*, *VvGPT*, *VvMEX* and *VvNTT1* gene that encodes the antiporter ADP/ATP of the plastidial membrane. On the other hand, in response to the infection, there was an increase in the concentration of total phenolics, hydroxycinnamic acids, flavonols and flavan-3-ols, particularly in leaves of plants in the mature phase (E-L 38). However, the expression of some key genes involved in the synthesis of these metabolites, such as *VvPAL* and *VvSTS*, did not change significantly. It was also observed that the reduction of chlorophylls can be controlled at the transcriptional level. The biochemical and molecular study of the changes induced by the phytoplasma of FD allowed to understand in more detail the reduction in the content of chlorophylls and the consequent leaf yellowing of the cv. Loureiro, as well as some of the molecular mechanisms in response to infection.

Palavras-chave: chlorophylls, *flavescence dorée*, *Vitis vinifera*, *VvCHLSYN*, *VvGGPPS11*

Tabela de Conteúdos

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
TABELA DE CONTEÚDOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.....	IX
INTRODUÇÃO	2
1.1. A VIDEIRA E A SUA IMPORTÂNCIA SOCIOECONÓMICA	2
1.2. PRINCIPAIS DOENÇAS DA VINHA	3
1.3. O FITOPLASMA DA FLAVESCÊNCIA DOURADA E A SUA DETEÇÃO EM VIDEIRA	3
1.4. O INSETO VETOR DA FLAVESCÊNCIA DOURADA.....	6
1.5. CONTROLO DO FITOPLASMA DA FLAVESCÊNCIA DOURADA	8
1.6. EFEITO DA FLAVESCÊNCIA DOURADA NO METABOLISMO DA VIDEIRA	10
1.7. OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	16
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA	16
2.3. DETEÇÃO DA FLAVESCÊNCIA DOURADA	17
2.4. QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS.....	18
2.5. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	19
2.6. QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES POR HPLC-RI	19
2.7. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	20
2.8. QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR HPLC-DAD	20
2.9. ESTUDOS DA EXPRESSÃO DE GENES POR PCR EM TEMPO REAL.....	21
2.9.1. <i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	21
2.9.2. <i>PCR em tempo real</i>	22
2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
RESULTADOS	25
3.1. DETEÇÃO DA FLAVESCÊNCIA DOURADA EM VIDEIRAS DA VARIEDADE LOUREIRO POR PCR EM TEMPO REAL.....	26
3.2. CONCENTRAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM PLANTAS INFETADAS E ASSINTOMÁTICAS	27

3.3. EXPRESSÃO DE GENES DAS VIAS DE BIOSÍNTESE DAS CLOROFILAS EM PLANTAS INFETADAS E ASSINTOMÁTICAS	29
3.4. CONCENTRAÇÃO DE FOTOASSIMILADOS EM FOLHAS DE PLANTAS INFETADAS E ASSINTOMÁTICAS E EXPRESSÃO DE GENES CHAVE DO METABOLISMO DOS AÇÚCARES.....	31
3.5. EXPRESSÃO DE GENES DO PLASTÍDEO EM FOLHAS DE PLANTAS INFETADAS E ASSINTOMÁTICAS.....	34
3.6. METABOLISMO SECUNDÁRIO EM FOLHAS DE PLANTAS INFETADAS E ASSINTOMÁTICAS.....	36
DISCUSSÃO	41
4.1. A TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PODE SER INEFICAZ PARA DIAGNOSTICAR A FLAVESCÊNCIA DOURADA EM FASES MAIS PRECOSES DO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO	42
4.2. AS VIAS DE BIOSÍNTESE DA CLOROFILA SÃO INIBIDAS EM FOLHAS DE PLANTAS INFETADAS COM FLAVESCÊNCIA DOURADA.....	43
4.3. O METABOLISMO DOS AÇÚCARES É MODIFICADO EM FOLHAS DE PLANTAS INFETADAS COM FLAVESCÊNCIA DOURADA.....	46
4.4. O METABOLISMO SECUNDÁRIO É MODIFICADO VIDEIRAS INFETADAS COM A FLAVESCÊNCIA DOURADA.....	50
CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	52
REFERÊNCIAS	56

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

BN	Bois Noir
CAT1	Cationic amino acid transporter
cDNA	DNA complementar
CHLSYN	Clorofila sintase
CTAB	Cethyl-trimethyl-ammonium bromide
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3, 5-dinitrosalicílico
DOC W	Denominação de Origem Controlada Vinhos Verdes
DRAPN	Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPPO	European Plant Protection Organization
FD	Flavescência dourada
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGPPS11	Geranilgeranil difosfato sintase
GGR	Geranilgeranil reductase
GPT2	Glucose-phosphate translocators 2
HPLC-DAD	High-performance liquid chromatography diode array detector
HPLC-RI	High-performance liquid chromatography refractive index
MEP	Non-mevalonate pathway pathway
MEX1	Maltose transporter 1
NaCl	Cloreto de sódio
NTT1	Plastidic ATP/ADP transporter 1
OIV	International Organisation of Vine and Wine
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pGT1	Plastidial glucose transporter 1
pGT2	Plastidial glucose transporter 2
pGT4	Plastidial glucose transporter 4

PPT	Phosphoenolpyruvate/phosphate translocator
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
qPCR	PCR em tempo real
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
STS	Stilbene sintase
SUSY4	Sucrose synthase 4
SWEET1	Sugars will eventually be exported transporter 1
SWEET10	Sugars will eventually be exported transporter 10
SWEET17a	Sugars will eventually be exported transporter 17a
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

1. Introdução

1. Introdução

1.1. A videira e a sua importância socioeconómica

Diferentes estudos sugerem que a domesticação da videira (*Vitis vinifera*) tenha ocorrido há cerca de 6000 anos na região do mar negro a partir do seu ancestral selvagem *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Terral et al., 2009; Ramos et al., 2014). Na Península Ibérica terá sido introduzida pelos romanos há cerca de 2800 anos, o que conduziu à expansão da vitivinicultura para a Europa ocidental (Arroyo-Garcia et al., 2006; Castro et al., 2013). Paralelamente ocorreu um segundo evento de domesticação, originando-se diferentes variedades (Terral et al., 2009). Em Portugal está descrita uma enorme diversidade de castas autóctones, contemplando cerca de 240 variedades (Mamaot., 2012; Cunha et al., 2016).

A cultura da vinha comporta uma elevada importância socioeconómica ao nível mundial, ocupando cerca de 7,4 milhões de hectares em todo o mundo, produzindo 77,8 milhões de toneladas de uvas, 57% das quais usadas para vinificação, 36% para consumo fresco (uvas de mesa) e 7% para a produção de uvas passas (dados de 2018 - OIV., 2019). A produção mundial de vinho em 2018 foi de 292 milhões de hectolitros, verificando-se um aumento de 17% em relação a 2017 (OIV., 2018; OIV., 2019). A Itália, a França e a Espanha foram os três maiores produtores de vinho ao nível mundial (OIV., 2019).

Em 2018, a área de vinha em Portugal ocupava 190 332 hectares que produziram 6 061 243 de hectolitros de vinho, dos quais 3 milhões foram exportados e cujo valor ascendeu aos 800 milhões de euros (OIV., 2019).

Neste sentido, Portugal é o quinto maior produtor de vinho da União Europeia (OIV., 2019). No entanto, contrariamente ao crescimento da produção de vinho ao nível mundial, em Portugal verificou-se uma diminuição de 10 % em 2018 face ao ano anterior, atribuído às condições climáticas desfavoráveis (OIV., 2018; OIV., 2019).

1.2. Principais doenças da vinha

As doenças nas plantas conduzem à perda de produtividade e, consequentemente, a perdas económicas avultadas (Zini et al., 2019). As diferentes variedades de videira usadas na produção de vinho possuem diferentes susceptibilidades a diversas doenças, sendo as mais comuns causadas por fungos como o míldio (*Plasmopara viticola*), o oídio (*Erysiphe necator*) e a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*) (Sannakki et al., 2013; Boubakri et al., 2015; Pap et al., 2016).

O míldio afeta sobretudo a produção e qualidade das uvas, causando infeções nas folhas e no cacho, redução da fotossíntese e vigor da planta (Boubakri et al., 2015). O oídio afeta todas as partes verdes da planta, causando diminuição da capacidade fotossintética e, consequentemente, à perda de produção que poderá ser total caso não seja controlada (Pap et al., 2016). A podridão cinzenta também se pode desenvolver rapidamente na vinha causando uma grande perda de produtividade (Boubakri et al., 2015).

O controlo destas doenças na viticultura convencional assenta na aplicação de fungicidas sistémicos e de contacto (Boubakri et al., 2015).

Além destas doenças, a videira é ainda susceptível ao ataque por pragas (traça da uva, aranhaço, etc) e infeções por vírus (ex. vírus do enrolamento, ESCA etc.) e fitoplasmas (ex. Bois Noir ou Flavescence dorée).

1.3. O fitoplasma da flavescência dourada e a sua deteção em videira

Os fitoplasmas *Candidatus Phytoplasma* são parasitas obrigatórios responsáveis por doenças em mais de 700 plantas economicamente importantes. *Candidatus Phytoplasma* é transmitida por insetos da ordem Hemiptera quando estes se alimentam do floema das plantas (Bai et al., 2006; Bertaccini et al., 2014) e tem a particularidade de ser capaz de invadir células de insetos e de plantas, organismos pertencentes a dois reinos distintos (Bai et al., 2006).

Técnicas de identificação por RFLP (polimorfismo dos fragmentos de restrição) revelaram a existência de 24 fitoplasmas diferentes pertencentes ao grupo ribossomal 16Sr que afetam as vinhas da maior parte das regiões vinícolas (Dermastia et al., 2017). As doenças de maior importância provocadas por fitoplasmas são a Bois Noir (BN) e flavescência dourada (FD) (Bertaccini et al., 2014).

A flavescência dourada é causada pelo fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis*, sendo as estirpes 16SrV-C e 16SrV-D transmitidas pelo inseto vetor *Scaphoideus titanus*. A estirpe 16SrV-D foi detetada no norte de Itália, França e Espanha onde a prevalência é elevada. A estirpe 16SrV-C pode ser encontrada no norte e centro de Itália e também na Europa de Leste, em países como a Sérvia (Angelini et al., 2001; Mori et al., 2002; Bertaccini et al., 2014). Outros fitoplasmas que infetam a videira foram identificados em outras regiões, como por exemplo a estirpe 16SrI-B na Itália e África do Sul, a estirpe 16SrVII-A no Chile e a estirpe 16SrXII-B na Austrália (Gajardo et al., 2009; Bertaccini et al., 2014) (Figura 1.1).

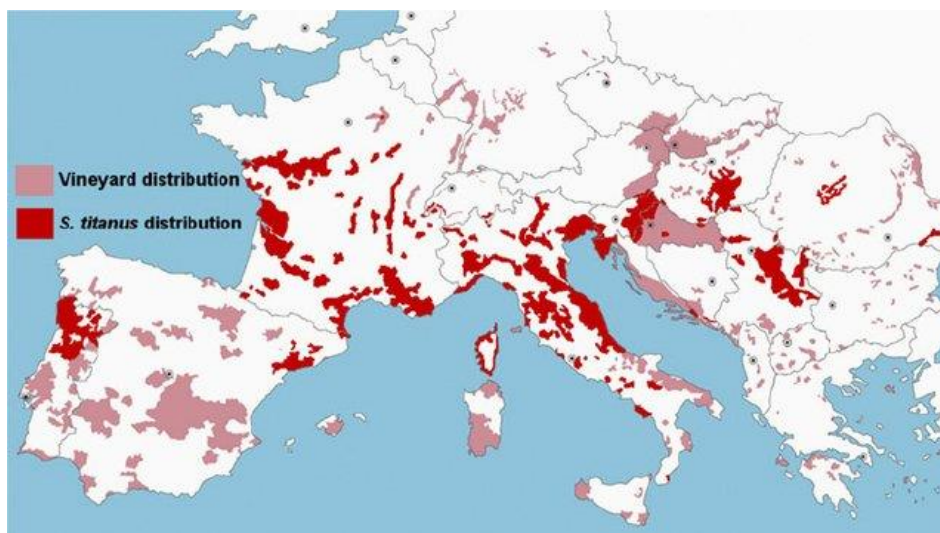


Figura 1.1. Distribuição do vetor do fitoplasma da flavescência dourada (*Candidatus Phytoplasma vitis*) na Europa (Chuche e Thiéry., 2014).

Os primeiros sintomas de infecção por FD ocorrem no início da primavera, quando se observa o atraso ou ausência do abrolhamento, crescimento reduzido da planta e redução da quantidade de

gomos florais (Chuche e Thiéry., 2014) (Tabela 1.1). Estima-se que a expansão do fitoplasma ocorra a um fator de 40 vezes num ano, o que rapidamente poderá levar à infeção total de uma vinha (Bressan et al., 2006; Prezelj et al., 2013).

Tabela 1.1. Sintomas de infeções causadas por fitoplasmas em diferentes órgãos de videira (adaptado de Ermacora e Osler., 2018; Bertamini e Nedunchezian., 2001; Bertaccini e Duduk., 2009; Bertaccini et al., 2014, Oliveira et al., 2019). Estes inseticidas são mais eficazes se forem aplicados no primeiro estágio de ninfa do inseto vetor (Bressan et al., 2006; Riolo et al., 2014; Chuche e Thiéry., 2014).

Órgãos	Sintomas
Foliares	Folhas pequenas e retorcidas
	Folhas amarelas ou vermelhas que podem apresentar necrose
	Enrolamento da folha
Florais	Alteração da cor das pétalas
	Alteração da morfologia de pétalas para folhas (<i>filoidia</i>)
	Esterilidade das flores
	Necrose
Frutos	Perdas de quantidade e qualidade
	Frutos pequenos
	Malformação e necrose
	Amadurecimento precoce ou tardio
Crescimento vegetativo	Nanismo
	Comportamento arbustivo
	Crescimento típico “Vassoura de bruxa” (<i>Witch's broom</i>)
	Crescimento irregular dos entrenós
	Lenhificação incompleta dos ramos
Outros	Propagação basal da raiz
	Necrose do floema
	Desenvolvimento precoce da parte reprodutiva antes do desenvolvimento vegetativo normal da planta (<i>bolting</i>)

Em Portugal, a FD é uma doença relativamente recente: foram identificados insetos vetores em 1998, embora a doença só tenha sido detetada nos vetores em 2002 (Quartau et al., 2001; Sousa et al., 2011; Torres et al., 2014). As primeiras infeções em videira causadas por fitoplasmas

foram detetadas em 2007 na Região Demarcada dos Vinhos Verdes, (DOC WV). Estudos de PCR e RFLP confirmaram a presença de uma estirpe do grupo 16SrV em videiras das castas Loureiro e Vinhão sintomáticas. Posteriormente, foram identificadas outras castas infetadas, como o Arinto, Trajadura, Padeiro e Tinta Barroca (Sousa et al., 2007; Sousa et al., 2011) (Figura 1.2).

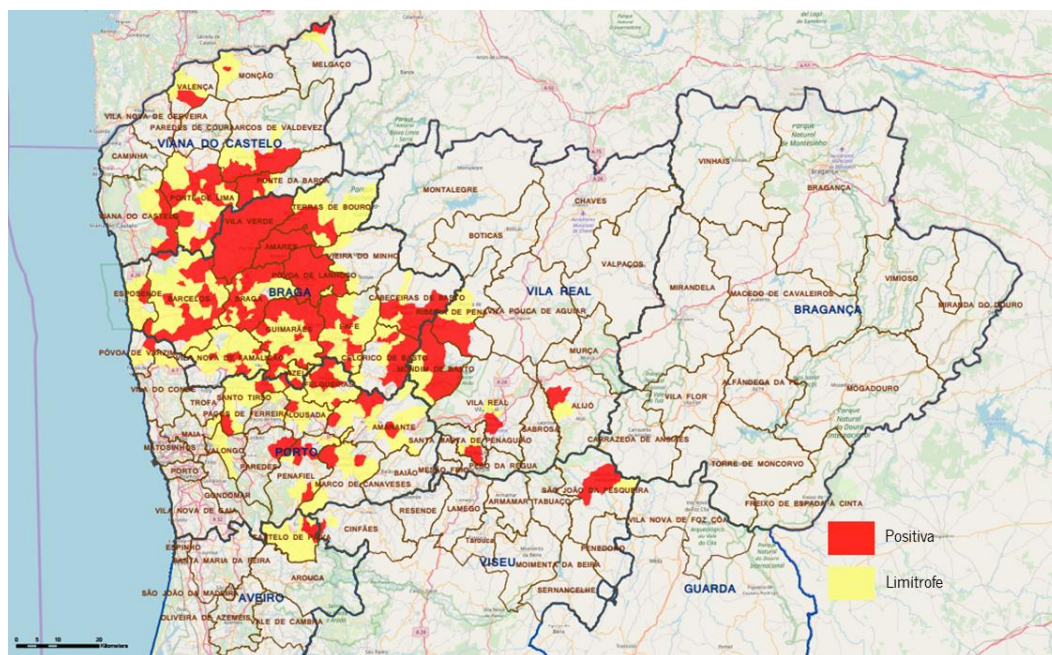


Figura 1.2. Situação da distribuição do vetor do fitoplasma da flavescência dourada (*Candidatus Phytoplasma vitis*) em Portugal, 2019 (DRAPN., 2019).

1.4. O inseto vetor da flavescência dourada

O insecto vetor da flavescência dourada, *Scaphoideus titanus*, foi inicialmente identificado em França, em 1958, em material vegetal infetado proveniente dos Estados Unidos. No entanto, as diferentes localizações dos insetos (uma no Sudoeste de França e outra no Sudeste de França e Noroeste de Itália) sugeriram dois episódios de introdução independentes (Arnaud et al., 2007; Chuche e Thiéry., 2014). Atualmente, o insecto vetor encontra-se em grande parte das zonas vitivinícolas da Europa e a sua distribuição geográfica ocorre de Portugal à Roménia, delimitando-se a norte pela região francesa de Champagne e a sul de Itália (Chuche e Thiéry., 2014; Tóthová et al., 2015).

O ciclo de vida do inseto *S. titanus* (Figura 1.3) inicia-se entre Agosto e Setembro com a deposição de cerca de 15 ovos em videiras com varas com mais de um ano, onde incubam durante o inverno (cerca de 6 a 8 meses) em diapausa (Bagnoli e Gargani., 2011; Eriksson et al., 2012; Chuche e Thiéry., 2014).

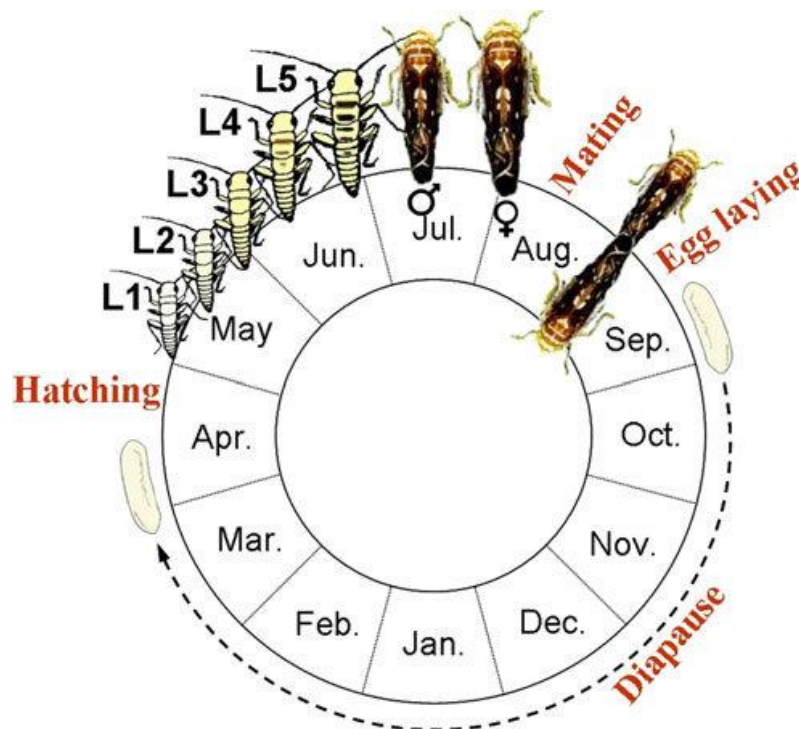


Figura 1.3. Ciclo de vida do inseto do fitoplasma da flavescência dourada *Scaphoideus titanus* (Chuche e Thiéry., 2014).

As temperaturas a que os ovos são expostos durante este período vão influenciar o início e a duração da incubação. As fêmeas são mais sensíveis às variações de temperatura, pelo que em anos mais frios ocorre maior protandria, ou seja, os machos eclodem antes das fêmeas. As diferentes respostas de machos e fêmeas à temperatura afetam a proporção local de fêmeas férteis para machos sexualmente ativos (“operational sex ratio”) (Chuche e Thiéry., 2012).

Em regiões com invernos suaves, os períodos de eclosão são extensos possibilitando a ocorrência de todos os estágios de desenvolvimento em simultâneo. Depois de 6 a 8 meses de incubação, por volta de Abril eclodem ninfas que passam por 5 estágios larvares durante 5 a 8

semanas (Chuche e Thiéry., 2014). Durante a fase adulta, de Julho a Setembro, o inseto apresenta maior capacidade de proliferação da doença, apesar de ser portador do fitoplasma nos outros 5 estágios de ninfa (Bressan et al., 2006; Riolo et al., 2014; Chuche e Thiéry., 2014). A menor eficiência das ninfas em transmitir a doença pode estar relacionada com a distância menor que o inseto consegue percorrer. Uma grande densidade de plantas na vinha resulta também numa maior densidade de insetos, o que levará a um aumento da prevalência da doença e, por sua vez, a uma maior dispersão para outras vinhas (Bressan et al., 2006; Riolo et al., 2014; Chuche e Thiéry, 2014).

A transmissão do fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis* através do inseto vetor *Scaphoideus titanus* divide-se em 3 etapas, a saber: i) aquisição, ii) período de latência e iii) inoculação. A aquisição do fitoplasma ocorre quando o inseto se alimenta do floema de uma planta (videira) infetada, segue-se um período de latência que pode durar de 1 a 11 semanas onde o fitoplasma se multiplica nos órgãos e hemolinfa do inseto e, por último, a inoculação quando o fitoplasma atinge as glândulas salivares (Lefol et al., 1994; Boudon-Padieu., 2000; Christensen et al., 2005; Chuche e Thiéry.,2014; Alma et al., 2019).

1.5. Controlo do fitoplasma da flavescência dourada

A flavescência dourada é uma doença de quarentena e o controlo do fitoplasma é feito por métodos diretos e métodos indiretos. Os métodos diretos baseiam-se sobretudo no tratamento das plantas por termoterapia em que o material de propagação vegetativa é colocado em água quente, a 50°C, durante 45 minutos (EPPO., 2012; DGAV., 2013; Sousa et al., 2014; DRAPN., 2019). Recorre-se também a inseticidas de modo a controlar o vetor, no entanto a sua utilização massiva elimina os insetos auxiliares predadores de praga bem como os polinizadores (DGAV., 2013; Sousa et al., 2014; DRAPN., 2019).

Os métodos indiretos incluem: 1) a queima de lenha de poda para se diminuir o número de ovos, 2) a utilização de material certificado, não infetado, 3) a implementação de práticas para aumentar as populações naturais de insetos auxiliares e para evitar o vigor excessivo das plantas, 4) a eliminação de videiras que evidenciem sintomas de FD, o abate de vinhas abandonadas e de vinhas com mais de 20% de videiras infetadas (DGAV., 2013; Sousa et al., 2014; DRAPN., 2019). Mais recentemente têm sido implementadas outras estratégias que apresentam algumas vantagens relativamente às práticas convencionais (Tabela 1.2) (Oliveira et al., 2019).

Tabela 1.2. Resumo de diferentes metodologias para o controlo da flavescência dourada (FD). (Adaptado de Oliveira et al., 2019)

Método	Vantagens	Desvantagens
Aplicação de inseticidas	Redução significativa da doença	Aplicação limitada em vinhas de produção biológica A eficácia depende da densidade do vetor Dispendioso Contaminação (águas e solo) Desenvolvimento de resistência Efeitos na saúde humana
Tratamento com água quente	Eliminação de fitoplasmas e de ovos de vetores	Possível redução da viabilidade e produtividade da planta quando o tratamento não é aplicado corretamente
Utilização de variedades menos suscetíveis/resistentes	Inofensivo para o meio ambiente e para a saúde humana	Poucos estudos sobre a suscetibilidades nas diversas castas A produção de vinho está restrita a variedades pré-estabelecidas A suscetibilidade influenciada por condições ambientais
Endófitismo (bactérias e fungos)	Inofensivo para o meio ambiente e saúde humana Eficiente em pequenas quantidades Taxa de degradação lenta Menos suscetível a induzir resistências Auto multiplicação Podem ser aplicados em sistemas de produção integrados	Necessária pesquisa para compreender a interação endófito-hospedeiro e o desenvolvimento de formulações químicas Obstáculos legislativos
Aplicação de elicitadores (Hormonas e efetores)	Inofensivo Indução eficiente de defesas naturais nas plantas	Efeitos antagónicos entre jasmonatos, salicilato e ácido abscísico Optimização de frequência e dosagem por aplicação
Modelos de previsão	Inofensivo Maior precisão na gestão da FD	Não representam um controlo direto Desenvolvimento demorado
Sinalização vibracional	Inofensivo Redução significativamente do vetor Afeta o comportamento de outras pragas	Não elimina os vetores nem o fitoplasma Não impede a reprodução Possíveis efeitos negativos na fauna benéfica

1.6. Efeito da flavescência dourada no metabolismo da videira

A resposta da videira à infecção por fitoplasmas depende da intensidade da infecção, da região da planta afetada, das condições ambientais, bem como da suscetibilidade das diferentes castas (Tabela 1.3) (Prezelj et al., 2013; Dermastia et al., 2017). Esta resposta traduz-se em profundas alterações metabólicas em videiras infetadas por fitoplasmas (BN e FD), que afetam o metabolismo primário e secundário da planta (Bertamini et al., 2002; Rusjan e Mikulic-Petkovsek., 2015; Dermastia et al., 2017). Estudos em videiras infectadas por fitoplasmas indicam a diminuição da fotossíntese, embora ainda não seja clara a existência de uma relação direta entre a diminuição da taxa fotossintética e a infecção (Bertamini et al., 2002; Albertazzi et al., 2009; Hren et al., 2009; Dermastia et al., 2017).

Tabela 1.3. Caracterização da suscetibilidade de variedades de videira (*Vitis vinifera*) à flavescência dourada (FD): (+++) Muito suscetível, (++) suscetível, (+) pouco suscetível. *Refere estudos diferentes com a mesma variedade.

Variedade	Susceptibilidade	Referências
Sauvignon Blanc*	+++	Eveillard et al., 2016
Cabernet sauvignon	+++	Steffek et al., 2007; Eveillard et al., 2016; Dermastia et al., 2017
Barbera	+++	Steffek et al., 2007; Dermastia et al., 2017
Pinot noir**	++	Steffek et al., 2007; Dermastia et al., 2017
Grenache	++	Eveillard et al., 2016
Chardonnay	++	Eveillard et al., 2016; Dermastia et al., 2017; Steffek et al., 2007
Cabernet Franc	++	Eveillard et al., 2016; Dermastia et al., 2017
Pinot Noir**	+	Eveillard et al., 2016
Nebbiolo	+	Dermastia et al., 2017
Merlot	+	Steffek et al., 2007; Eveillard et al., 2016; Dermastia et al., 2017
Sauvignon Blanc*	+	Steffek et al., 2007; Dermastia et al., 2017
Syrah	+	Steffek et al., 2007; Eveillard et al., 2016; Dermastia et al., 2017
Magdeleine	+	Eveillard et al., 2016

Em várias variedades infetadas por FD e BN (Chardonnay, Grenache, Marselan e Vermentino) verificou-se uma diminuição dos pigmentos fotossintéticos das folhas, nomeadamente clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais (Bertamini e Nedunchezhiam., 2001; Al-Saddik et al., 2019). Outros estudos em folhas de videira infetadas com BN (cv. Chardonnay) indicam a

diminuição da expressão de genes que codificam proteínas dos fotossistemas (*chlorophyll binding proteins*) (Hren et al., 2009), bem como a repressão do gene ribulose-bisphosphate carboxylase (*RbcL*) responsável pela subunidade maior da Rubisco e do gene que codifica a Rubisco activase (RCA) (Hren et al., 2009; Dermastia et al., 2017).

Em videiras cv. Nebbiolo e Barbera infetadas com FD verificou-se a diminuição da expressão dos genes acima referidos (Margaria e Palmano., 2011; Margaria et al., 2013), bem como diminuição da quantidade de Rubisco e Rubisco activase e de subunidades da ATP sintase cloroplastidial (Dermastia et al., 2017). Verificou-se ainda um decréscimo gradual da taxa fotossintética na videira menos pronunciado em anos secos (Vitali et al., 2013).

Vários estudos apontam para que fitoplasmas BN e FD consigam manipular o metabolismo da planta de modo a aumentar a produção de açúcares utilizados pelo fitoplasma como fontes de carbono e energia (Berger et al., 2007; Hren et al., 2009; Dermastia et al., 2017). Em folhas da variedade Chardonnay infetada por BN ocorreu um aumento de glicose, frutose e sacarose (Prezelj et al., 2014; Dermastia et al., 2017). Contudo, em folhas infetadas de variedade Modra frankinja os valores de glicose e frutose não aumentaram, ao contrário dos valores de sacarose e amido (Prezelj et al., 2016). Nas variedades Grenache, Marselan, Vermentino e Chardonnay ocorreu um aumento dos açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) e dos açúcares totais (Al-Saddik et al., 2019). Vários estudos têm mostrado que o aumento de açúcares nas folhas ocorre, pelo menos em parte, devido à obstrução causada pela deposição de calose (polímero de glicose) nos tubos crivosos do floema (Musetti et al., 2013; Hren et al., 2009; Santi et al., 2013; Dermastia et al., 2015; Oliveira et al., 2019).

Estudos de expressão de genes que codificam transportadores de açúcares em folhas de videira da variedade Chardonnay infetadas com BN mostraram a diminuição da expressão do *SUC27* (SUCrose transporter 27) responsável pelo carregamento do floema (Dermastia et al., 2017). Nas

variedades Chardonnay e Modra frankinja infetada por BN e FD verificou-se o aumento da expressão de genes que codificam a sacarose sintase (*VvSUSY*) (Santi et al., 2013a, b; Prezelj et al., 2016).

Em folhas de videira da variedade Modra frankinja infetadas com FD foram ainda descritas alterações na expressão de genes da família dos SWEETs, nomeadamente o aumento dos níveis de transcritos do gene *VvSWEET17a*, responsável pelo transporte frutose através do tonoplasto (Prezelj et al., 2016). Pelo exposto, o aumento da quantidade de açúcares nas folhas de plantas infetadas pode resultar da obstrução do floema causada pelo fitoplasma, mas também da modificação da expressão de genes chave envolvidos no metabolismo dos açúcares. Por outro lado, a acumulação de açúcares nas folhas pode resultar na inibição da fotossíntese por um mecanismo de feedback negativo e consequente clorose (perda de pigmentação - clorofilas) nas folhas (Christensen et al., 2005).

Ao longo de milhões de anos do processo evolutivo as plantas desenvolveram uma série de defesas contra pragas e organismos patogénicos. Com efeito, a produção de metabolitos secundários, como as fitoalexinas ou flavonoides, aumentam a resistência das plantas ao ataque por fungos e bactérias, devido às suas propriedades antimicrobianas (Goufo et al., 2019).

As fitoalexinas mais relevantes são compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, flavonoides, stilbenos, proantocianidinas ou antocianinas. O aumento destes compostos está normalmente associado a doenças na vinha, como a FD, BN ou ESCA (Margaria et al., 2014; Martin et al., 2019; Goufo et al., 2019).

Diferentes estudos têm mostrado que a via dos fenilpropanoides e a via dos flavonoides são afetadas em videiras infetadas com BN, ocorrendo um aumento da expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela acumulação de vários compostos fenólicos, bem como a atividade enzimática destas proteínas, incluindo a fenilalanina amónia liase (PAL), a chalcona sintase (CSH), a flavanona 3-hidroxilase (F3H) e a leucoantocianidina dioxigenase (LDOX) (Hren et al., 2009;

Landi e Romanazzi., 2011; Rusjan et al., 2012; Dermastia et al., 2015; Dermastia et al., 2017). Na variedade Manzoni Bianc verificou-se ainda um aumento da expressão de genes que codificam a zeaxantina epoxidase (ZEP), envolvida na síntese de carotenóides e das enzimas PAL, cinamato-4-hidroxilase (C4H) e 4-coumaroil-CoA ligase (4CL) pertencentes à via dos fenilpropanóides (Albertazzi et al., 2009). Nas variedades 'Barbera', 'Nebbiolo' e 'Modra frankinja' infetadas com FD foi descrito um aumento em tecidos foliares da concentração de ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e flavan-3-ols. Resultados semelhantes foram observados nas variedades Tocai friulano e Chardonnay (Margaria et al., 2014; Prezelj et al., 2016; Bertazzon et al., 2019).

1.7. Objectivos

Ao longo da última década foram publicados diferentes estudos sobre o efeito da flavesccência dourada na videira. Estes estudos incidiram no metabolismo primário e secundário de variedades francesas (Chardonnay e Cabernet sauvignon) ou italianas (Nebbiolo e Barbera), e incluíram estudos analíticos de quantificação de carboidratos e compostos fenólicos nas folhas de videiras infetadas, bem como estudos de expressão de genes-chave (Margaria et al., 2014; Prezelj et al., 2016; Al-Saddik et al., 2019; Bertazzon et al., 2019). Outros estudos mostraram que a infeção induz a diminuição das clorofilas e carotenóides totais (Bertamini e Nedunchezhiam., 2001; Al-Saddik et al., 2019), bem como alterações na expressão de genes e proteínas envolvidas no funcionamento e estabilização do aparelho fotossintético (Margaria e Palmano., 2011; Margaria et al., 2013; Dermastia et al., 2017). Estudos apontam para variações na suscetibilidade à FD entre as diferentes variedades estudadas (como descrito anteriormente na tabela 1.3), no entanto pouco se sabe acerca do efeito da infeção no metabolismo primário e secundário de variedades portuguesas como a variedade Loureiro. Esta casta, juntamente a Alvarinho, é uma das mais

utilizadas na produção de vinho na Região Demarcada dos Vinhos Verdes (DOC VV), possuindo grande importância económica.

No presente trabalho foram utilizadas videiras da variedade Loureiro de uma vinha comercial (Quinta do Corvo, Fafe) que tinham sido diagnosticadas previamente como portadoras da doença, decorrente de uma colaboração em curso com os grupos de investigação liderados pela Prof. Susana Carvalho da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e pela Prof. Marta Vasconcelos da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

Foi colocada então a hipótese que a diminuição observada no teor de clorofila em folhas infetadas é mediada pela repressão de genes-chave envolvidos na biossíntese de clorofilas. O presente trabalho envolveu estudos analíticos, de bioquímica e de biologia molecular para se estudarem os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na resposta da casta Loureiro à FD: i) estudo do metabolismo primário em resposta à infeção, mediante a quantificação dos principais açúcares e dos níveis de transcritos de genes de proteínas transportadoras, ii) quantificação dos pigmentos fotossintéticos, como clorofilas e carotenóides totais, e estudos de expressão de genes que codificam enzimas chave da via de biossíntese destes metabolitos, e iii) estudo do metabolismo secundário, mediante a quantificação de fenólicos totais e identificação de flavonoides, potencialmente envolvidos em mecanismos de proteção da videira contra a infeção.

Este trabalho enquadra-se nos objetivos do projeto FCT BerryPlastid (PTDC-BIA-FBT/28165/2017) no âmbito da tarefa 5 que visa compreender as alterações metabólicas que ocorrem no plastídio de videiras infetadas com FD, pelo que outras abordagens se encontram ainda em curso no sentido de se completar a tarefa.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

A recolha do material biológico foi efetuada numa vinha comercial localizada no norte de Portugal na região dos Vinhos verdes, Fafe - Quinta do Corvo (41°31'03.5", -8°12'45.6"). Esta vinha tem uma área de 8 hectares e a parcela de amostragem foi plantada com orientação nordeste-sudoeste. Apresenta um solo granítico franco arenoso, situando-se entre os 300 m e os 400 m de altitude. A parcela onde foi efetuada a amostragem foi plantada com uma casta branca, variedade Loureiro, onde a FD foi previamente diagnosticada e tem sido estudada por um grupo da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

Foram realizadas amostragens em dois estados de desenvolvimento do cacho; fase verde (abertura do cacho - E-L 33) e uma segunda na fase bago maduro (E-L 38; Coombe et al., 1995). Foram amostradas 4 videiras previamente diagnosticadas com FD e 4 videiras controlo que não apresentavam sinais visíveis de infeção. De cada videira foram colhidas 4 folhas. Assim, para cada fase de desenvolvimento fenológico e condição foram recolhidas dezasseis folhas. Posteriormente, as amostras foram transportadas para o laboratório (4 °C), moídas com azoto líquido e separadas em duas partes. Uma foi congelada a -80 °C para posterior extração de DNA e RNA, e outra foi liofilizada para ensaios bioquímicos.

2.2. Extração de DNA

A extração de DNA de folhas de videira foi realizada de acordo com o método descrito por Reid et al., (2006). Sucintamente, a ± 300 mg de pó de folha de cada amostra, previamente moídas em azoto líquido, foi adicionado 1.8 mL de tampão CTAB (300 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% de CTAB, 2% de PVP) suplementado com 40 mM DTT e pré-aquecido a 65 °C. A mistura foi homogeneizada, incubada a 65 °C durante 15 min e agitada a cada 2 min. Seguiu-se

uma centrifugação a $3500 \times g$ durante 15 min a 4°C. A fase aquosa foi obtida recorrendo a uma dupla extração do sobrenadante com 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1(v/v)) e novamente centrifugada nas condições descritas. Para a precipitação dos ácidos nucleicos, adicionou-se à fase aquosa 0,1 volumes de 3 M de acetato de sódio (CH_3COONa), 0,3 volumes de isopropanol e incubadas a -80 °C durante 30 min. Seguiu-se uma centrifugação a $18000 \times g$ durante 30 min a 4 °C. O *pellet* foi lavado com etanol a 70% (v/v) e ressuspendido em 30 μL H_2O ultrapura autoclavada. O DNA foi quantificado num Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) e a sua integridade foi observada por eletroforese num gel de 1% de agarose suplementado com 0,5% da sonda SYBR- safe (Qiagen).

2.3. Detecção da flavescência dourada

A confirmação da presença ou ausência de infeção por flavescência dourada e outros fitoplasmas foi efetuada por PCR em tempo real, usando o DNA anteriormente extraído. Para a detecção de fitoplasmas na videira foram usados primers universais (UNI) bem como primers específicos para detecção de BN e FD. Como controlo positivo foram usados primers para o gene *VvGPT2* (Tabela 2.1).

A reação de PCR em tempo real foi realizada numa placa de 96 poços, usando um kit comercial (Grisp Xpert Fast SYBR-Blue). Sucintamente, as reações de qPCR foram efetuadas em triplicado (réplicas técnicas) usando, 10 μL de MasterMix, 300 μM de cada primer, 1 μL de DNA e H_2O livre de nucleases perfazendo um volume final de 20 μL . As condições no termociclador (CFX96-Real-Time System da BIORAD) foram as seguintes: 2 min a 95 °C, 45 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 5 s, hibridação a 55 °C durante 20 s e extensão a 72 °C durante 20 s. A especificidade de cada reação foi visualizada com uma curva de *melting* com início nos 65 °C e incrementos sucessivos de 0,5 °C até aos 95 °C.

Tabela 2.1. Sequências dos primers forward e reverse dos genes utilizados na detecção de fitoplasmas.

Gene	Código do Genbank/NCBI/Genoscope	Primers		Referência
BN	AF447594	Forward	5' AAG CAG GTT TAG CGA TGG TTG 3'	Hren et al., 2007
		Reverse	5' TGG TAC CGT TGC TTC ATC ATT T 3'	
FD	AY197685	Forward	5' TTA TGC CTT ATG TTA CTG CTT CTA TTG TTA 3'	Hren et al., 2007
		Reverse	5' TCT CCT TGT TCT TGC CAT TCT TT 3'	
UNI	-	Forward	5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3'	Hren et al., 2007
		Reverse	5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3'	
VvGPT2	GSVIVT00006900001	Forward	5' TCA ATG CTC TTG GAG CTG CCA TC 3'	Noronha et al., 2015
		Reverse	5' CTT CCT CAC TGC TTT GCC TGA G 3'	

2.4. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*; clorofila *b* e carotenóides), foi feita de acordo com um dos métodos apresentados em Lichtenthaler e Wellburn., (1983). Para extração dos pigmentos fotossintéticos foram utilizados 50 mg de pó liofilizado e 1,5 mL de metanol. A mistura foi homogeneizada e incubada durante 24 h a 4 °C no escuro. No final deste período as amostras foram centrifugadas a 11000 $\times g$, e recuperado o sobrenadante. A leitura das absorvâncias dos pigmentos fotossintéticos foi feita a 666, 653 e 470 nm em sobrenadantes diluídos 10x, num espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu Pharmaspec UV-1700). A quantificação dos diferentes pigmentos foi feita de acordo com as equações apresentadas por Lichtenthaler e Wellburn., (1983) com os coeficientes de extinção molar para extração com metanol: $Chl a = 15,65 A_{666} - 7,34 A_{653}$; $Chl b = 27,05 A_{653} - 11,21 A_{666}$; $Cx+c = (1000 A_{470} - 2,86 Ca - 129,2 Cb) / 245$.

2.5. Quantificação de açúcares redutores

Para quantificação dos açúcares redutores foram utilizados 50 mg de pó liofilizado e 1 mL de H₂O ultrapura previamente aquecida. Cada amostra foi vigorosamente agitada num vórtex e o homogeneizado foi centrifugado a 11000 $\times g$ durante 10 min. O sobrenadante foi recuperado e o *pellet* novamente ressuspendido para uma segunda extração. A quantificação dos açúcares redutores foi feita pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Após conjugação dos dois sobrenadantes, 250 μ L de amostra foram colocados num tudo de reação com 250 μ L de DNS, e a mistura foi incubada num banho a 100 °C durante 3 min. A reação foi interrompida retirando as amostras do banho e adicionando 2,5 mL de H₂O ultrapura fria. A absorvância de cada amostra foi lida num espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20) a 540 nm. A concentração dos açúcares redutores foi determinada usando uma curva de calibração de glicose com a equação ($Abs = 0,0005[glicose] - 0,0048$).

2.6. Quantificação e identificação de açúcares por HPLC-RI

A identificação de açúcares por HPLC foi feita de acordo com o método descrito por Conde et al., (2015). Sucintamente, para cada estágio de desenvolvimento e condição, os açúcares de 50 mg de pó de folha liofilizado foram extraídos em 1 mL H₂O ultrapura e o extrato foi vigorosamente agitado num vórtex. Posteriormente foi adicionado 1 volume de clorofórmio a cada amostra, e a mistura foi vigorosamente agitada durante 5 min e colocada numa incubadora a 50 °C durante 30 min com agitação contínua (1400 r.p.m.). As amostras foram centrifugadas a 11000 $\times g$ durante 20 min e o sobrenadante foi filtrado recorrendo a uma membrana de nitrocelulose com um poro de 0.2 μ m. A concentração de açúcares presente em cada amostra foi quantificada por HPLC-RI usando uma coluna Rezex RCM-Monosaccharide Ca²⁺ (8%) (Phenomenex). O fluxo usado foi de 0.2 mL min⁻¹, a 40 °C, usando H₂O como fase móvel. A identificação e concentração de açúcares de cada

amostra foi determinada comparando a área e o tempo de retenção dos picos com a área e o tempo de retenção de curvas padrão.

2.7. Quantificação de compostos fenólicos totais

Para quantificação dos fenólicos totais foram utilizados 50 mg de pó de folha liofilizado e 1,5 mL de metanol 100%. As amostras foram vortexadas e colocadas num agitador rotativo a 100 r.p.m durante 15 min. Seguiu-se uma centrifugação a 13400 $\times g$ durante 20 min. A 20 μ L de sobrenadante foram adicionados 1,58 mL de H₂O e 100 μ L de reagente de Folin. A mistura foi incubada 5 min no escuro, à temperatura ambiente, e foram depois adicionados 300 μ L de carbonato de sódio a 2 M. Após incubação no escuro durante 1 h, a mistura foi diluída 10 x e determinada a sua absorvância a 750 nm no espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 20.

A concentração dos fenólicos totais foi determinada usando uma curva de calibração do ácido gálico com a equação ($Abs = 0,0385[\text{ácido gálico}] + 0,0128$).

2.8. Quantificação e identificação de compostos fenólicos totais por HPLC-DAD

A identificação de compostos do metabolismo secundário por HPLC-DAD foi feita a partir extratos de folhas de videiras infetadas e respetivas folhas controlo. A extração foi feita usando 50 mg de pó de folha liofilizado, aos quais foi adicionado 1 mL de etanol:H₂O a 80% (v/v). As amostras foram homogeneizadas num agitador rotativo a 100 r.p.m. durante 15 min e centrifugadas a 13400 $\times g$ durante 20 min. O sobrenadante foi filtrado com uma membrana de nitrocelulose com um poro de 0.2 μ m. As amostras foram corridas num HPLC-DAD (HITACHI, LabChrom Elite, Japão) com o software EZChorme elite. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (LiChrospher 100 RP-18e, 5 μ m, Merk, Germany). A corrida foi realizada à temperatura ambiente utilizando dois solventes na fase móvel, solvente A, metanol e o solvente B água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico, seguindo um

gradiente de eluição (tabela 2.2) durante 60 min cada, com um fluxo de 0.8 mL min⁻¹. A detecção foi realizada entre os 250-600 nm e os cromatogramas registados a 260, 280 e 350 nm. Os picos dos cromatogramas foram analisados manualmente tendo em conta o espectro de absorção e tempo de retenção.

Tabela 2.2. Gradiente de eluição utilizado no HPLC-DAD.

Tempo (min)	Solvente A %	Solvente B %
0	5	95
5	5	95
30	50	50
40	90	10
45	90	10
50	5	95
60	5	95

2.9. Estudos da expressão de genes por PCR em tempo real

2.9.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA de cada condição foi realizada de acordo com o método descrito por Reid et al. (2006), usando 50 mg de pó de folha de videira. Os ácidos nucleicos obtidos no final da extração foram purificados com um kit comercial (Grisp GRS Total RNA Kit – Plant). Sucintamente, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 500 µL tampão R1 do kit seguindo-se posteriormente as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado num Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) e a sua integridade foi observada por eletroforese num gel de 1% de agarose suplementado com 0,5% da sonda SYBR- safe (Qiagen). Para a conversão de RNA em cDNA foi utilizado um kit comercial (Grisp Xpert cDNA Synthesis Mastermix) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído 10x e a sua eficiência foi testada com uma reação de PCR em tempo real, usando primers do gene constitutivo Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*VvGAPDH*) (NCBI/Genbank: XM_002263109; Gainza-Cortés et al., 2012).

2.9.2. PCR em tempo real

O efeito da FD foi avaliado ao nível da expressão de genes-chave envolvidos em diversas vias metabólicas, nomeadamente, a via da biossíntese das clorofilas, na via *non-mevalonate* (MEP), o transporte de açúcares e a biossíntese de compostos fenólicos. Para o efeito, foram desenhados primers específicos para cada um dos genes selecionados (Tabela 2.3). A expressão dos genes foi normalizada com a do gene de referência *VvGAPDH* codificante da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (NCBI/Genbank: XM_002263109; Gainza-Cortés et al. 2012). A especificidade de cada reação foi visualizada através de uma curva de *melting*, com início nos 65 °C e incrementos sucessivos de 0,5°C até aos 95 °C. Os dados foram analisados com o *software* CFX Manager Software (Bio-Rad laboratories, Inc.).

Tabela 2.3. Sequências dos primers forward e reverse dos genes-chave selecionados para estudos de PCR em tempo real.

Gene	Código do Genbank/NCBI/Genoscope	Primers		Referência
<i>VvCHLSYN</i>	XM_002263235.3	Forward	5' GCGTACGGTGGCAGA CTGAATATC 3'	Este estudo
		Reverse	5' AGC AGA GGC CAT GAT ACG TTG C 3'	
<i>VvGGPPS11</i>	XM_002273753.4	Forward	5' AGT TCG TGC AGT CGG CGA ATT G 3'	Este estudo
		Reverse	5' TGC CCT GCA ACA AGT CCT TCT G 3'	
<i>VvGGR</i>	XM_002273097.4	Forward	5' AAA CGA CGT GTC GCC GGA TTT C 3'	Este estudo
		Reverse	5' ACT GCC ACA TGG TCG CAT TTC G 3'	
<i>VvCAT1</i>	GSVIVT01021609001	Forward	5' CCG TCT TCT GCT ACA CTG AGT TCG 3'	Este estudo
		Reverse	5' AAG TAG GCA AAC GAC CCA CCA G 3'	
<i>VvPGT1</i>	GSVIVT01030495001	Forward	5' ATT GGG AGT TAC CTG GGA ATG GC 3'	Este estudo
		Reverse	5' AGT TGT TCA TCC ACT GGC GAA ATG3'	
<i>VvPGT2</i>	GSVIVT01015361001	Forward	5' TCA ATG CTC TTG GAG CTG CCA TC 3'	Este estudo
		Reverse	5' CTT CCT CAC TGC TTT GCC TGA 3'	
<i>VvPGT4</i>	GSVIVT01031006001	Forward	5' TAA CAA GCT TTG CTG GGA TGG C 3'	Este estudo
		Reverse	5' GGG CAC TCC AAG TGA AAG AGA AGG 3'	
<i>VvGPT2</i>	GSVIVT00006900001	Forward	5' TCA ATG CTC TTG GAG CTG CCA TC 3'	Noronha et al., 2015
		Reverse	5' CTT CCT CAC TGC TTT GCC TGA G 3'	
<i>VvPPT</i>	GSVIVT01007730001	Forward	5' GGG AAC TTG GTT CAG ACG TT 3'	Este estudo
		Reverse	5' CCT TCA GAA CCT GCT TGT TG 3'	
<i>VvMEX1</i>	GSVIVT01024263001	Forward	5' GTC TTG TGG CCG TTG TTA TGG C 3'	Este estudo
		Reverse	5' TGG CAT CCA CAT GAA GAG AAG TG 3'	
<i>VvNTT1</i>	GSVIVT01017211001	Forward	5' TTT CAG CAA GAG TGC CAA GT 3'	Este estudo
		Reverse	5' TCC CTT TAA CCT TGG TGT CC 3'	
<i>VvSWEET1</i>	GSVIVT01010015001	Forward	5' GGA TGC TCA TCA TGC TCT TCA 3'	Chong et al., 2014
		Reverse	5' AAG CAG AGA GAA GGC AGT TGA G 3'	
<i>VvSWEET17a</i>	GSVIVT01035138001	Forward	5' GGT TTT GGT GTG GTT GTT GAA 3'	Chong et al., 2014
		Reverse	5' AGC TAG AAA CCC CAC ATC CAA 3'	

(continuação)

Gene	Código do Genbank/NCBI/Genoscope	Primers		Referência
<i>VvSTS</i>	NM_001281117.1	Forward	5' CGA AGC AAC TAG GCA TGT GT 3'	Boubakri et al., 2013
		Reverse	5' CTC CCC AAT CCA ATC CTT CA 3'	
<i>VvPAL</i>	XM_002281763.4	Forward	5' CCG AAC CGA ATC AAG GAC TG 3'	Boubakri et al., 2013
		Reverse	5' GTT CCA GCC ACT GAG ACA AT 3'	
<i>VvGAPDH</i>	XM_002263109	Forward	5' TTC CGT GTT CCT ACT GTT G 3'	Gainza-Cortés et al., 2012
		Reverse	5' CCT CTG ACT CCT CCT TGA T 3'	

2.10. Análise estatística

Os resultados foram obtidos a partir de amostras em triplicado e apresentados com a média $\pm$ desvio padrão (SD). Estes foram analisados utilizando o teste de *t*-Student e one-way ANOVA no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc, USA). As diferenças significativas nos testes one-way ANOVA e *t*-Student são identificadas por letras, ou asteriscos onde: **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,5$; ns $p \geq 0,05$.

3. Resultados

3. Resultados

3.1 Deteção da flavescência dourada em videiras da variedade Loureiro por PCR em tempo real

Como referido nos Materiais e Métodos, para este estudo foram amostradas folhas de plantas com sintomas visíveis de FD (infetadas) e de plantas assintomáticas (controlo) em dois estados de desenvolvimento do cacho: fase verde (abertura do cacho, E-L 33) e fase de bago maduro (E-L 38; Coombe et al. 1995).

Os ensaios de deteção da FD por PCR em tempo real, usando primers específicos, confirmaram a presença do fitoplasma em folhas de plantas sintomáticas no estado de desenvolvimento E-L38 (fase madura) (Figura 3.1). Em contraste, no estado E-L 33 (abertura do cacho) o fitoplasma não foi encontrado, tanto em folhas de plantas sintomáticas como assintomáticas.

Foram ainda usados primers para a deteção do fitoplasma responsável pela doença Bois Noir (BN) e primers universais (UNI) para a deteção de outros fitoplasmas. Os resultados sugeriram que as videiras não estão infetadas por estes fitoplasmas. Como controlo positivo foi amplificado o gene codificante de um translocador de glicose-6-fosfato (*VvGPT2*) que revelou estar expresso em todos os estágios de desenvolvimento e condições fitossanitárias (Figura 3.1), o que nos permitiu validar o protocolo de rastreio da doença.

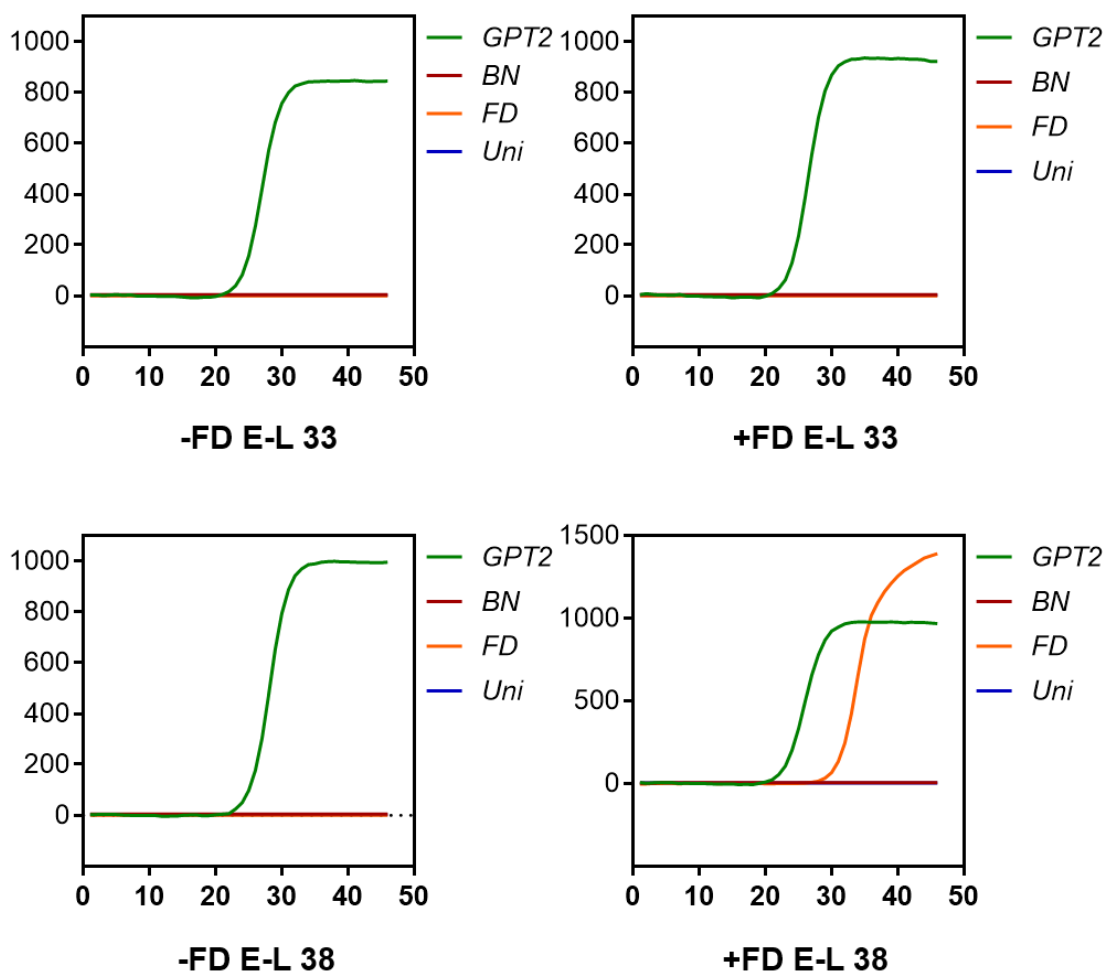


Figura 3.1. Detecção do fitoplasma da flavesccência dourada em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). Nos gráficos está indicada a expressão do gene codificante para a proteína transportadora de glicose-6-fosfato (*VvGPT2*) utilizado como controlo positivo, do transcrito identificativo da infeção por Bois Noir (*BN*), do transcrito identificativo da infeção por flavesccência dourada (*FD*) e de um gene universal de deteção fitoplasmas (*Uni*).

3.2 Concentração dos pigmentos fotossintéticos em plantas infetadas e assintomáticas

Como se pode observar na figura 3.2, os resultados mostraram que as folhas das plantas infetadas (+FD) possuem menos pigmentos fotossintéticos que as folhas das plantas assintomáticas (-FD). Com efeito, em folhas de plantas infetadas a concentração de clorofila *a* foi 18% e 55% inferior, nas fases E-L 33 e E-L 38, respetivamente, relativamente aos controlos.

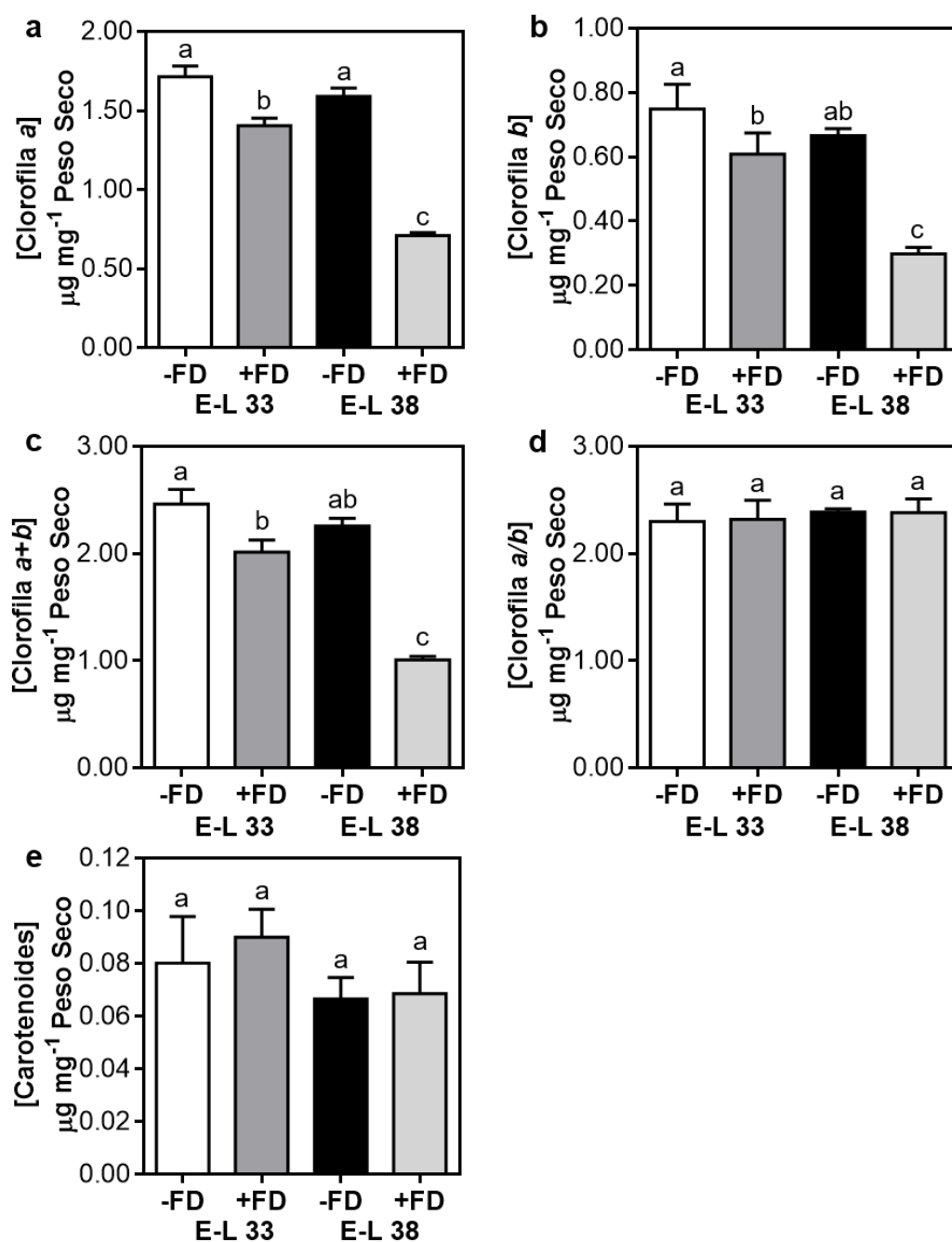


Figura 3.2. Concentração de clorofilas e carotenóides em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). (a) Concentração de clorofila *a*, (b) Concentração de clorofila *b*, (c) Concentração de clorofilas *a+b*, (d) Concentração de clorofilas *a/b*, (e) concentração de carotenóides.

Contrariamente aos resultados obtidos em folhas de plantas assintomáticas, onde não se verificaram diferenças significativas nos níveis de clorofila entre os estados de desenvolvimento, nas

folhas de plantas infetadas ocorreu uma redução de 50% da clorofila *a* da fase E-L 33 para a fase E-L 38 (Figura 3.2a).

A quantificação de clorofila *b* revelou um padrão semelhante ao observado para a clorofila *a* (Figura 3.2b). Com efeito, foi observado que na fase E-L 33 ocorreu uma redução de 17% dos níveis de clorofila *b* em folhas de plantas infetadas relativamente aos controlos, enquanto que na fase E-L 38 a redução foi de 55%. Por outro lado, em folhas de plantas sintomáticas observou-se uma redução de 51% dos teores de clorofila *b* da fase E-L 33 para a fase E-L 38.

O somatório da clorofila *a* e da clorofila *b* (*a+b*) revelou uma acentuada diminuição dos pigmentos fotossintéticos em folhas infetadas com flavescência dourada (Figura 3.2c). Verificou-se ainda que a flavescência dourada teve um impacto negativo equivalente em ambos os pigmentos fotossintéticos, uma vez que as razões clorofilas *a/b* não sofreram variação (Figura 3.2d).

Ao contrário dos resultados obtidos relativamente ao teor de clorofilas, outros pigmentos da folha como os carotenóides totais não foram significativamente afetados pela flavescência dourada (Figura 3.2e).

3.3 Expressão de genes das vias de biossíntese das clorofilas em plantas infetadas e assintomáticas

Com o objetivo de compreender os resultados anteriores que mostraram uma redução significativa dos pigmentos fotossintéticos em plantas sintomáticas, os estudos prosseguiram com o estudo da expressão relativa de genes-chave codificantes de proteínas envolvidas nas vias de biossíntese dos pigmentos fotossintéticos.

Os resultados da Figura 3.3a mostram que em folhas de plantas assintomáticas os níveis de transcritos do gene *VvCHLSYN*, que codifica a clorofila sintase, aumentaram significativamente (ca. 60%) do estado E-L 33 para o estado E-L 38, no entanto, a infeção pela flavescência dourada

impediu este aumento dos níveis de transcritos. Com efeito, na fase E-L 38 os níveis de transcritos do gene *VvCHLSYN* em folhas de plantas sintomáticas foram 63% inferiores aos níveis de transcritos quantificados em folhas de plantas assintomáticas.

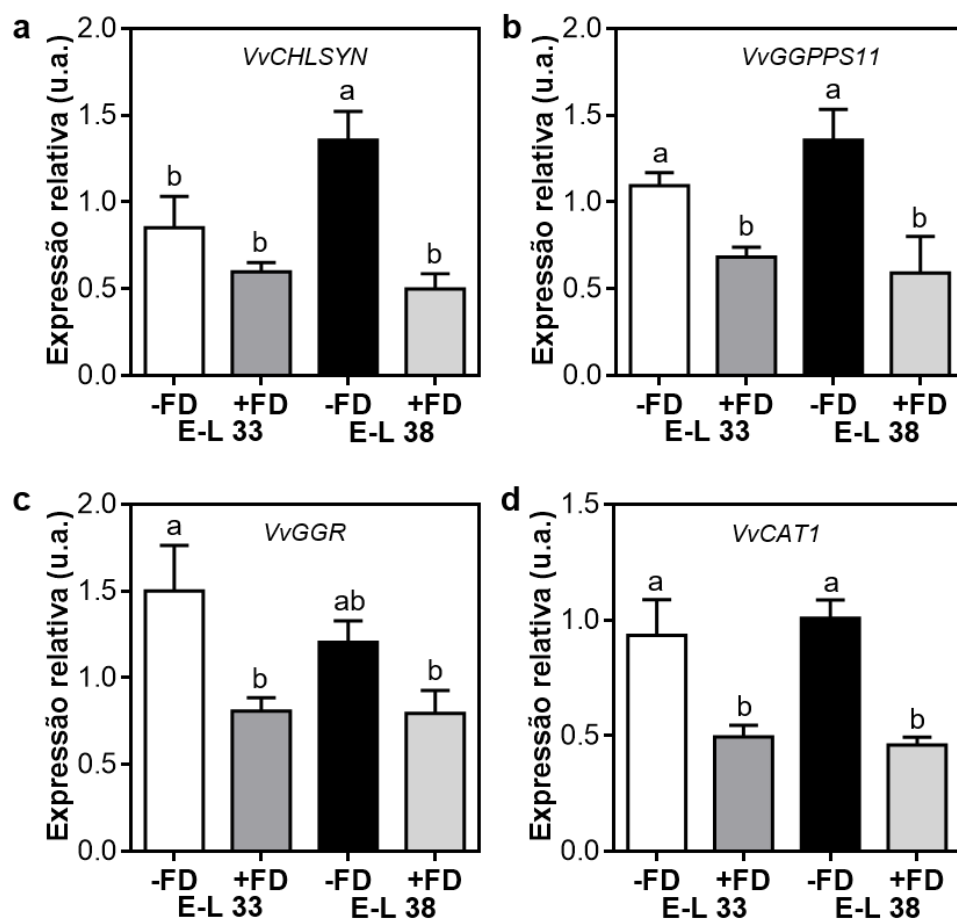


Figura 3.3. Expressão relativa de genes responsáveis pela síntese de clorofilas em em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). Expressão relativa do gene codificante de (a) clorofila sintase (*VvCHLSYN*), (b) geranilgeranil difosfato sintase (*VvGGPPS11*), (c) geranilgeranil redutase (*VvGGR*), (d) transportador de aminoácidos CAT1 (*VvCAT1*).

A expressão do gene *VvGGPPS11* que codifica a enzima geranilgeranil difosfato sintase apresentou um padrão de expressão semelhante à do gene *VvCHLSYN* em resposta à infecção (Figura 3.3b).

A expressão do gene *VvGGR*, que codifica a proteína geranilgeranil reductase, diminuiu apenas em folhas infetadas na fase E-L 33 (Figura 3.3c), em comparação com o controlo. A expressão do gene codificante do transportador de aminoácidos *VvCAT1* revelou um padrão semelhante aos genes anteriores, tendo sido medido um decréscimo dos níveis de transcritos em folhas de plantas infetadas de 47% na fase E-L 33 e 54% na fase E-L 38 (Figura 3.3d).

3.4 Concentração de fotoassimilados em folhas de plantas infetadas e assintomáticas e expressão de genes chave do metabolismo dos açúcares

Os resultados mostraram que em folhas de videiras infetadas com FD os níveis de açúcares redutores aumentaram 11% (na fase E-L 33) e 34% (na fase E-L 38) (Figura 3.4a), em comparação com os controlos. Ao contrário do observado em folhas de plantas assintomáticas, em folhas de videiras infetadas a concentração de açúcares redutores aumentou 13% da fase E-L 33 para a fase E-L 38 (Figura 3.4a). Para avaliar com maior precisão o impacto da FD no metabolismo dos fotoassimilados na folha, os principais açúcares foram quantificados por cromatografia líquida (HPLC-RI). Na fase E-L 38, observou-se um aumento significativo de 18% nos níveis de sacarose em folhas infetadas em relação ao controlo (Figura 3.4b).

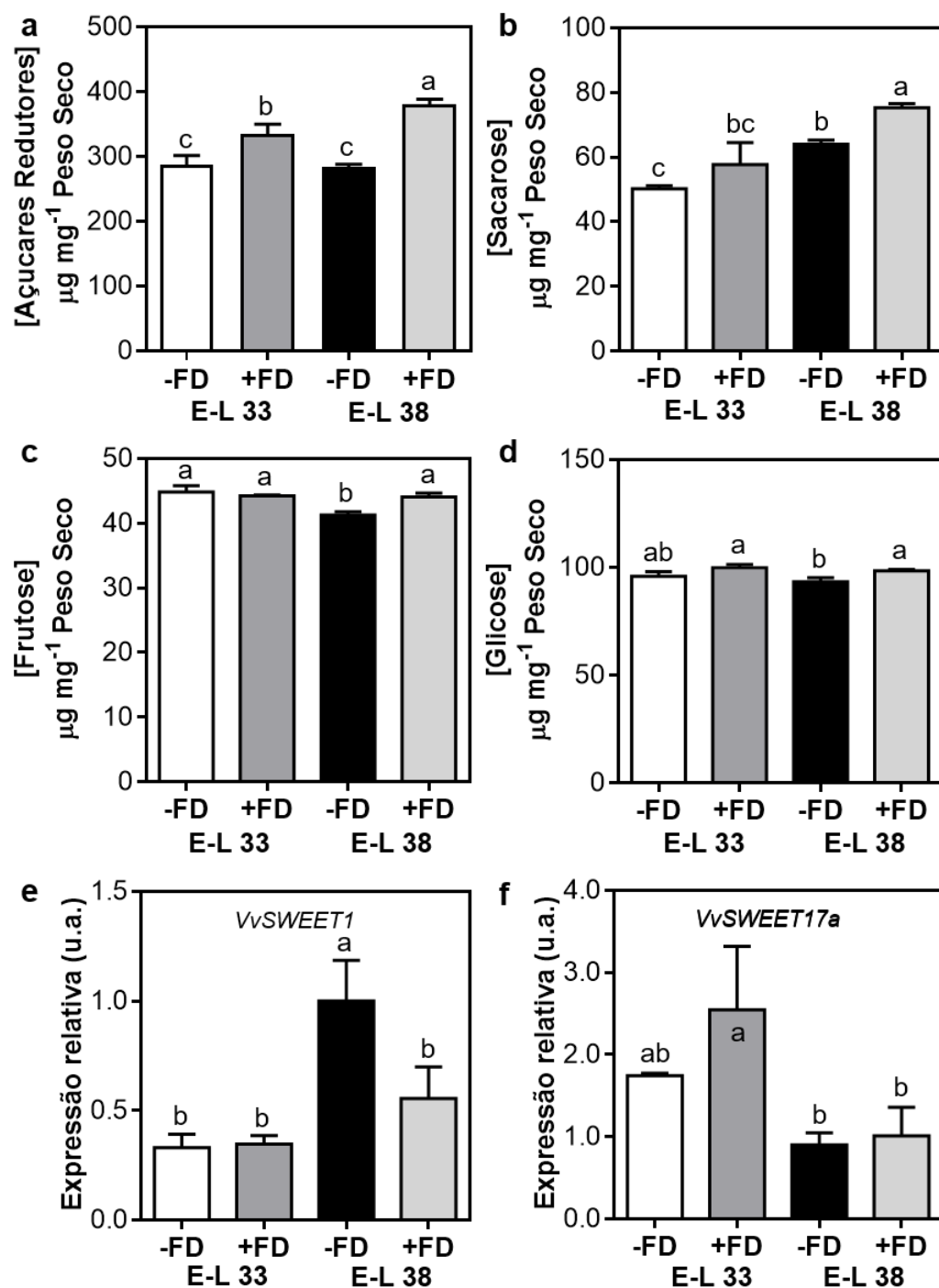


Figura 3.4. Concentração de açúcares e expressão relativa de genes responsáveis pelo transporte plasmidial de açúcares em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). (a) Concentração de açúcares redutores, (b) concentração de sacarose, (c) concentração de frutose, (d) concentração de glicose. Expressão relativa dos genes transportadores de açúcar (e) *SWEET1* e (f) *SWEET17a*.

Relativamente aos açúcares redutores, na fase E-L 38 verificou-se que a concentração de frutose foi ligeiramente superior (7%) em folhas de videiras infetadas do que em folhas de videiras assintomáticas (Figura 3.4c). Na fase E-L 38, a concentração de glicose aumentou também ligeiramente (5%) em folhas infetadas relativamente ao controlo (Figura 3.4d). Estes resultados sugerem que outros açúcares redutores, para além da frutose e da glicose, devem ter contribuído para o aumento de 34% observada em folhas de videiras infetadas na fase E-L 38.

Os resultados apresentados na figura 3.4e mostram que em folhas de plantas assintomáticas os níveis de transcritos do gene *VvSWEET1*, que codifica um transportador bidirecional de açúcares de baixa afinidade membranar, aumentaram significativamente (200%) do estado fenológico E-L 33 para a fase E-L 38, no entanto, este aumento foi impedido pela infeção. Com efeito, na fase madura os níveis de transcritos do *VvSWEET1* em folhas de plantas infetadas foram 44% menores que em folhas de plantas assintomáticas.

Em folhas de plantas assintomáticas os níveis de transcritos do gene *VvSWEET17a* sofreram uma redução da fase E-L 33 para a fase E-L 38, tendo sido obtido um padrão semelhante em folhas de plantas infetadas (Figura 3.4f). Ao contrário do *VvSWEET1*, a expressão do *VvSWEET17a* não foi significativamente afetada pela infeção.

3.5 Expressão de genes do plastídeo em folhas de plantas infetadas e assintomáticas

A expressão relativa de alguns genes que codificam proteínas plastidiais foi estudada para se tentar compreender o efeito da flavescência dourada no efluxo dos açúcares produzidos no plastídio. Em folhas de plantas assintomáticas, a expressão do gene *VvpGT1* que codifica uma proteína exportadora de glicose sofreu uma redução substancial da fase E-L 33 para a fase E-L 38, tendo-se observado um padrão semelhante em folhas de plantas infetadas (Figura 3.5a). Os níveis de transcritos do gene sofreram uma redução significativa de 47% em folhas de plantas infetadas apenas na fase E-L 33 (Figura 3.5a).

A expressão do gene *VvpGT2* revelou um padrão de expressão semelhante ao gene *VvpGT1* (Figura 3.5b).

Os níveis de transcritos do gene *VvpGT4* também sofreram uma redução em folhas assintomáticas da fase E-L 33 para a fase E-L 38, tendo-se observado um padrão semelhante em folhas de plantas infetadas, sendo que em ambas as fases não se observou qualquer efeito da infecção na expressão do gene (Figura 3.5c).

A expressão do gene *VvGPT2* que codifica uma proteína importadora de glicose-6-fosfato da membrana plastidial sofreu uma redução acentuada em folhas de plantas assintomáticas da fase E-L 33 para a fase E-L 38, no entanto, esta redução não foi medida em folhas de plantas infetadas (Figura 3.5d). Com efeito, em folhas de plantas infetadas na fase E-L 38 os níveis de transcritos do gene foram 333% superiores aos medidos em folhas controle de plantas assintomáticas.

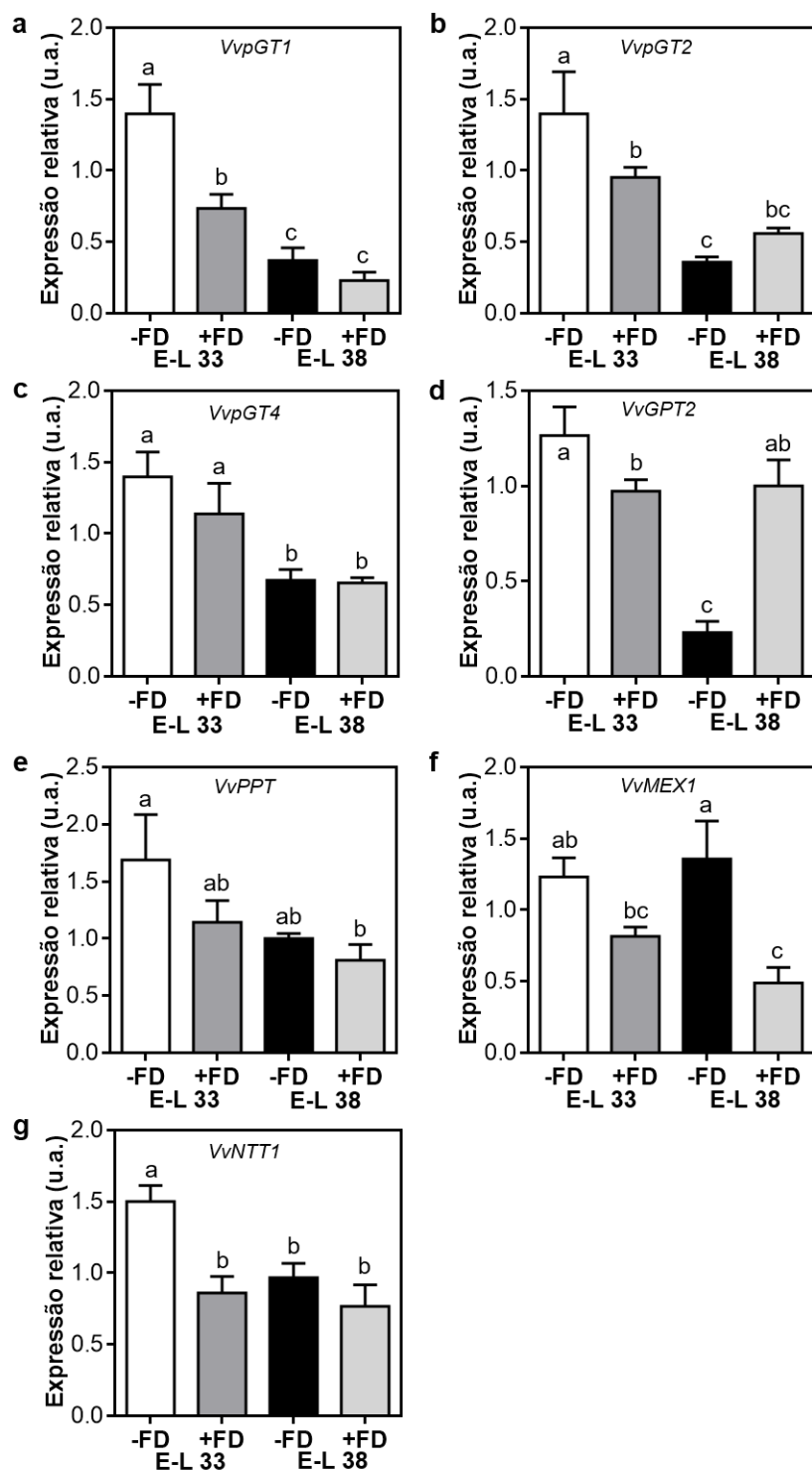


Figura 3.5. Expressão relativa de genes do plastídio em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). Expressão relativa dos genes responsáveis pelo transporte plastidial de açúcares (a) *VvpGT1*, (b) *VvpGT2*, (c) *VvpGT4*, (d) *VvGPT2*, de fosfoenolpiruvato (e) *VvPPT*, de maltose (f) *VvMEX1*, e de ATP (g) *VvNTT1*.

A expressão do gene *VvPPT* que codifica a proteína importadora de fosfoenolpiruvato da membrana plastidial foi menor em folhas de videira na fase E-L 38 do que na fase E-L 33 e este padrão foi semelhante em folhas de plantas infetadas, não se tendo verificado qualquer efeito da infeção na expressão do gene em ambas as fases (Figura 8e). Ao contrário, o efeito da infeção pela FD foi bem evidente na expressão do gene *VvMEX* que codifica uma proteína exportadora de maltose da membrana plastidial. Com efeito, na fase E-L 38 os níveis de transcritos do gene foram 64% em inferiores em folhas infetadas do que em folhas de plantas assintomáticas (Figura 3.5f).

A expressão do gene *VvNTT1* que codifica uma proteína antiportadora de ATP com ADP da membrana plastidial também diminuiu ao longo do desenvolvimento em folhas de plantas assintomáticas, da fase E-L 33 para a fase E-L 38. A infeção pela FD teve um impacto negativo na expressão do *VvNTT1* apenas na fase E-L 33 onde se observou uma diminuição de 33% do número de transcritos (Figura 3.4g).

3.6 Metabolismo secundário em folhas de plantas infetadas e assintomáticas

Em folhas de plantas infetadas na fase E-L 38 o teor de compostos fenólicos totais foi 30% superior ao medido em folhas controlo (Figura 3.6a). No entanto, quando se mediu a expressão de dois genes chave que codificam enzimas do metabolismo secundário, a fenilalanina amónia liase (*VvPAL*) e a stilbeno sintase (*VvSTS*), observou-se que o aumento do conteúdo em fenólicos totais não deve resultar do aumento da sua síntese, uma vez que a expressão destes genes foi substancialmente reprimida na fase E-L 33 (Figura 3.6b,c).

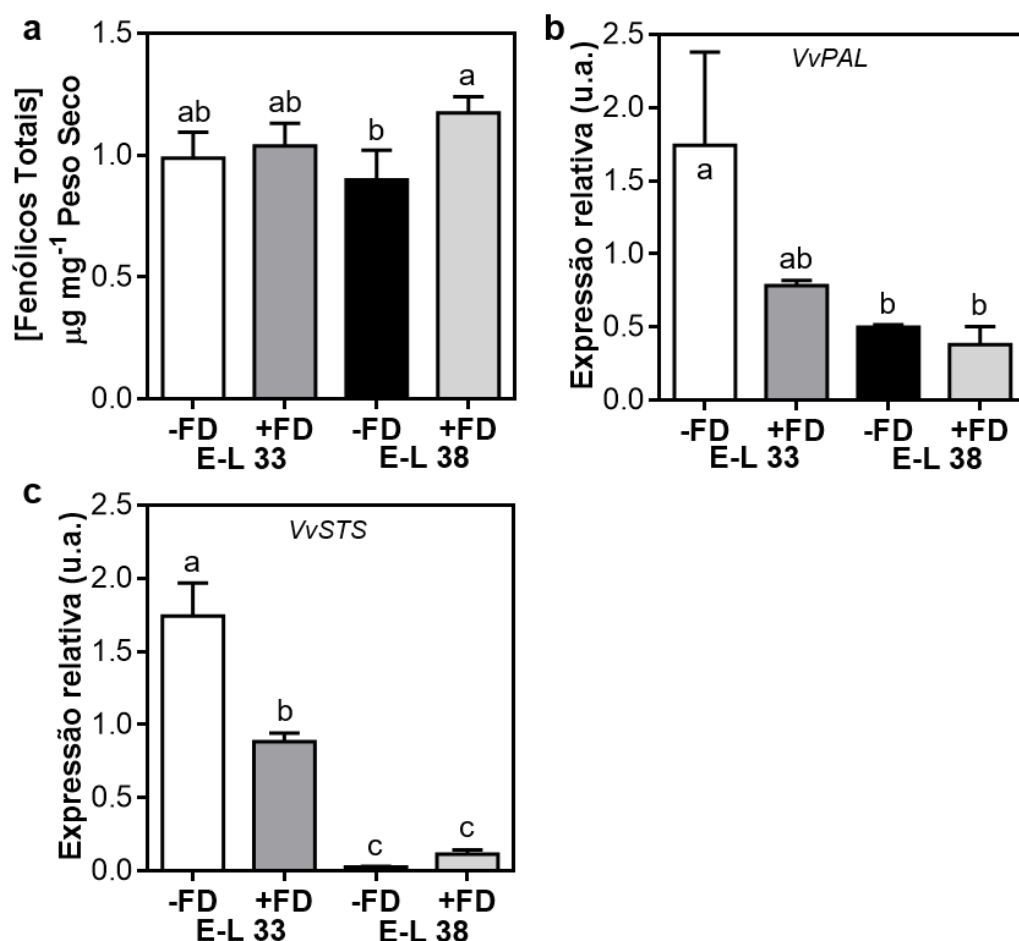


Figura 3.6. Concentração de fenólicos totais e expressão relativa de genes de metabolismo secundário em folhas de videira assintomáticas (-FD) e sintomáticas (+FD) nas fases de desenvolvimento vegetativo verde (E-L 33) e maduro (E-L 38). (a) Concentração de compostos fenólicos totais. Expressão relativa dos genes codificantes das enzimas (b) stilbeno sintase (*VvSTS*) e (c) fenilalanina amónia liase (*VvPAL*).

De modo a caracterizar o perfil de compostos secundários que se acumulam nas folhas em resposta à infeção, procedeu-se à análise dos extratos etanólicos por HPLC-DAD (Figura 3.7). Foram identificados 3 grupos de compostos: os ácidos hidroxicinâmicos, os flavonóis e os flavan-3-ols. Quando se quantificaram os ácidos hidroxicinâmicos identificaram-se duas isoformas de ácido cafeoiltartárico, sendo que apenas uma delas apresentou uma diminuição significativa de 10% em folhas infetadas na fase E-L 33 em comparação com o controlo. Por outro lado, na fase E-L 38

ambas as isoformas sofreram um aumento significativo. Foram também identificadas duas isoformas de ácido cumaroiltartárico. Na fase E-L 33, apenas uma delas sofreu um aumento em folhas infetadas (32%), enquanto que na fase E-L 38 ambas as isoformas apresentam diferenças significativas. Os ácidos hidroxicinâmicos totais diminuíram 5% em folhas de videiras infetadas na fase E-L 33, contrariamente ao medido na fase E-L 38, onde se verificou um aumento em comparação com os respetivos controlos (Figura 3.8a).

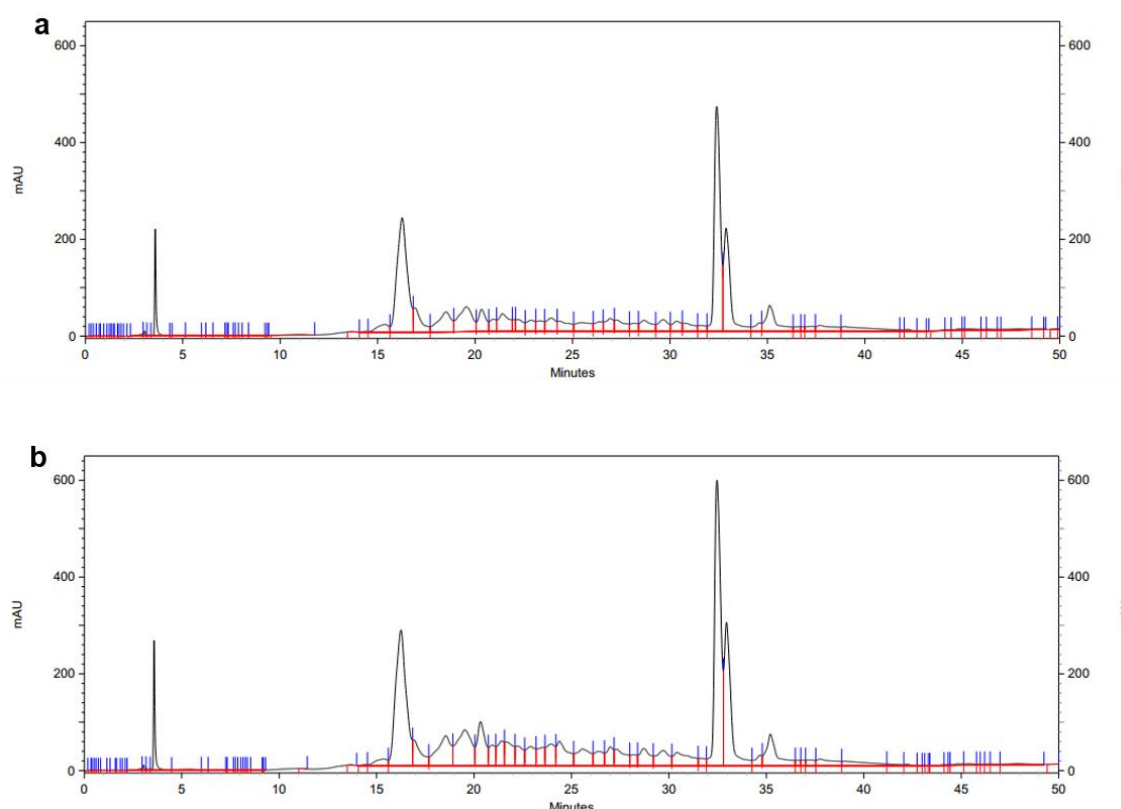


Figura 3.7. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (280 nm) referentes à análise de extratos etanólicos de folhas de videira da variedade Loureiro controlo e infetadas com flavesência dourada na fase maduro (E-L 38). (a) Cromatograma dos compostos de folhas de videiras controlo, e (b) infetadas com flavesência dourada.

Relativamente aos flavonóis, em plantas na fase E-L 38 observou-se um aumento de 10% dos níveis de quercetina-3-O-glicósido em folhas de plantas infetadas em comparação com o controlo. De forma similar, a quercetina-3-O-galactósido sofreu um aumento em ambas as fases de

desenvolvimento em resposta à infecção. Foram ainda detetados outros derivados de quercetina, não identificados, para os quais se verificou um aumento significativo nas fases E-L 33 e E-L 38. Os níveis de campferol-3-glicósido e de um seu derivado aumentaram em resposta à doença em ambas as fases (Figura 3.8b).

Relativamente aos flavan-3-ols, foram identificados dois derivados de catequinas que apresentaram um aumento significativo em folhas de plantas infetadas na fase E-L 33 em comparação com o controlo. Na fase E-L 38 observou-se um aumento nos níveis de quatro derivados (não identificados) das catequinas e a diminuição de um quinto metabolito pertencente a esta família (Figura 3.8c).

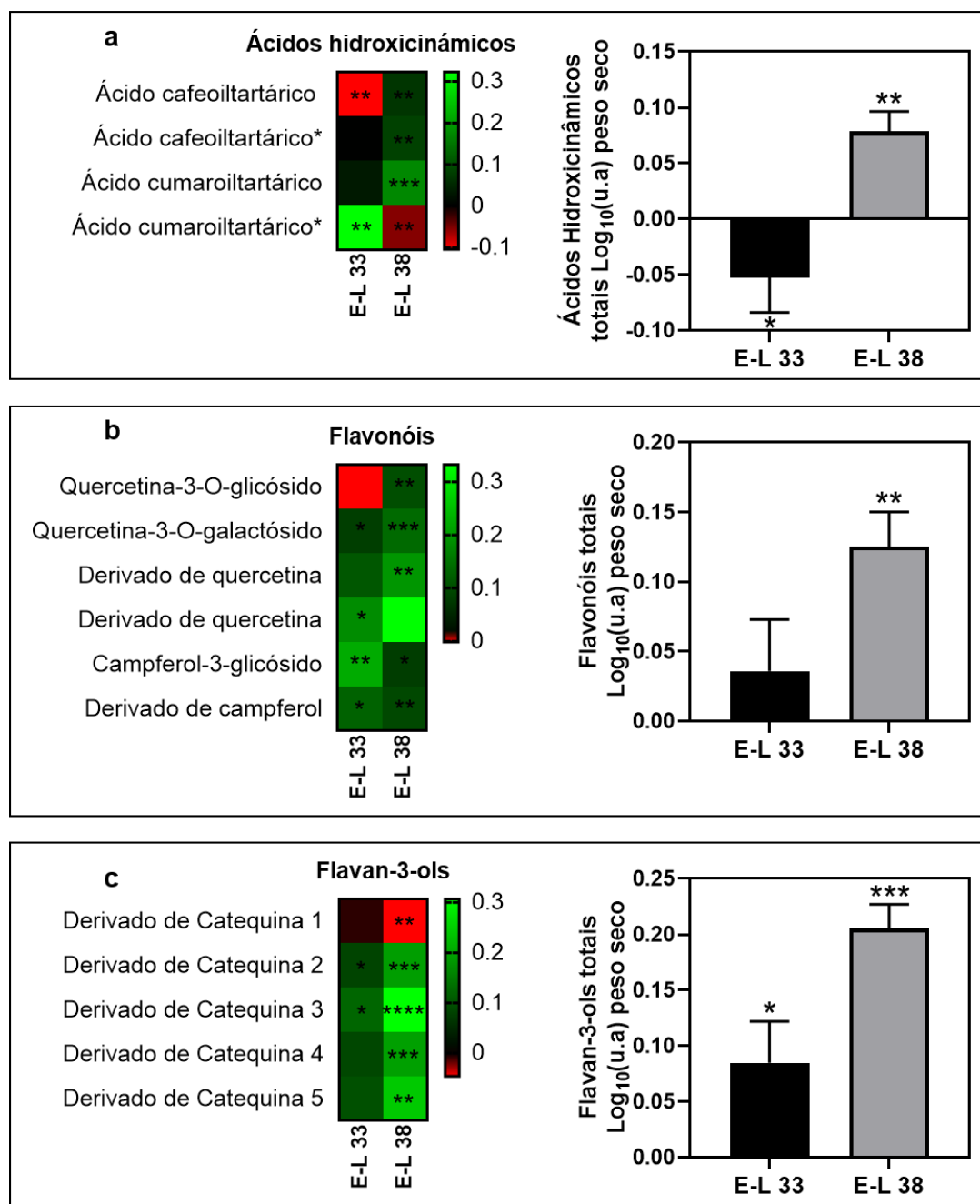


Figura 3.8. Rácio entre os níveis de compostos fenólicos analisados por HPLC-DAD em folhas infetadas *versus* controlo, em dois estados fenológicos E-L 33 (verde) e E-L 38 (maduro). (a) Ácidos hidroxycinâmicos, (b) flavonóis, (c) flavan-3-ols.

4. Discussão

4. Discussão

4.1. A técnica de PCR em tempo real pode ser ineficaz para diagnosticar a flavescência dourada em fases mais precoces do desenvolvimento vegetativo

Em folhas de videira da variedade Loureiro na fase de desenvolvimento E-L 38 (fase madura), com claros sintomas de infecção por flavescência dourada (FD), foi detetada a presença do fitoplasma por PCR em tempo real, recorrendo a primers específicos. Este trabalho beneficiou da otimização da técnica que foi conseguida anteriormente no âmbito da tese de mestrado de Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas (Departamento de Biologia, Universidade do Minho, 2016) onde a doença foi diagnosticada em videiras da mesma variedade na Estação Vitivinícola Amândio Galhano. A experiência tem mostrado que em algumas plantas sintomáticas não é possível detetar a presença do fitoplasma. Com efeito, estudos realizados por Botti e Bertaccini (2007) em 1424 amostras de videiras sintomáticas mostraram que 37% das plantas não evidenciaram a presença dos fitoplasmas responsáveis pela flavescência dourada (FD) e pelo Bois Noir (BN). A ocorrência de falsos negativos pode estar relacionada com a fase de desenvolvimento da planta, uma vez que fases mais precoces de desenvolvimento vegetativo, como a fase E-L 33, estão normalmente associadas com uma menor proliferação dos fitoplasmas nos tecidos da planta. No presente estudo, a FD também não foi detetada em folhas de plantas na fase E-L 33, ao contrário de estudos anteriores realizados na mesma vinha (julho de 2015), que identificaram a estirpe 16SrV-D do fitoplasma em nervuras de folhas de todas as 16 videiras sintomáticas amostradas (Oliveira et al., 2020). Portanto, um método tão preciso como o PCR em tempo real, pode ser incapaz de diagnosticar eficazmente a doença. No presente estudo foi usado DNA de toda a folha o que pode explicar a ausência de deteção em fases mais precoces. Estudos anteriores mostraram que nas variedades Modra frankinja e Refošk o fitoplasma é detetado em fases

mais tardias do desenvolvimento vegetativo em tecidos como veias foliares, pecíolos, película, polpa e pecíolo pedicelo ou pedúnculo (Prezelj et al., 2013).

4.2. As vias de biossíntese da clorofila são inibidas em folhas de plantas infetadas com flavescência dourada

O decréscimo dos níveis de clorofilas conduz ao amarelecimento das folhas (Leon et al., 1996; Vitali et al., 2013). No presente trabalho foi observado que em folhas de videira infetadas ocorreu uma grande diminuição do teor em clorofilas *a* e clorofilas *b*, mais pronunciada na fase madura (E-L 38) (Figura 4.1). Nas variedades Chardonnay, Grenache, Marselan e Vermentino infetadas com BN e FD também foram descritos valores inferiores de clorofilas *a* e *b* (Bertamini e Nedunchezian., 2001; Al-Saddik et al., 2019). Como esperado, a redução do teor em clorofilas traduz-se numa menor taxa fotossintética (Bertamini e Nedunchezian., 2001; Vitali et al., 2013; Oliveira et al., 2020).

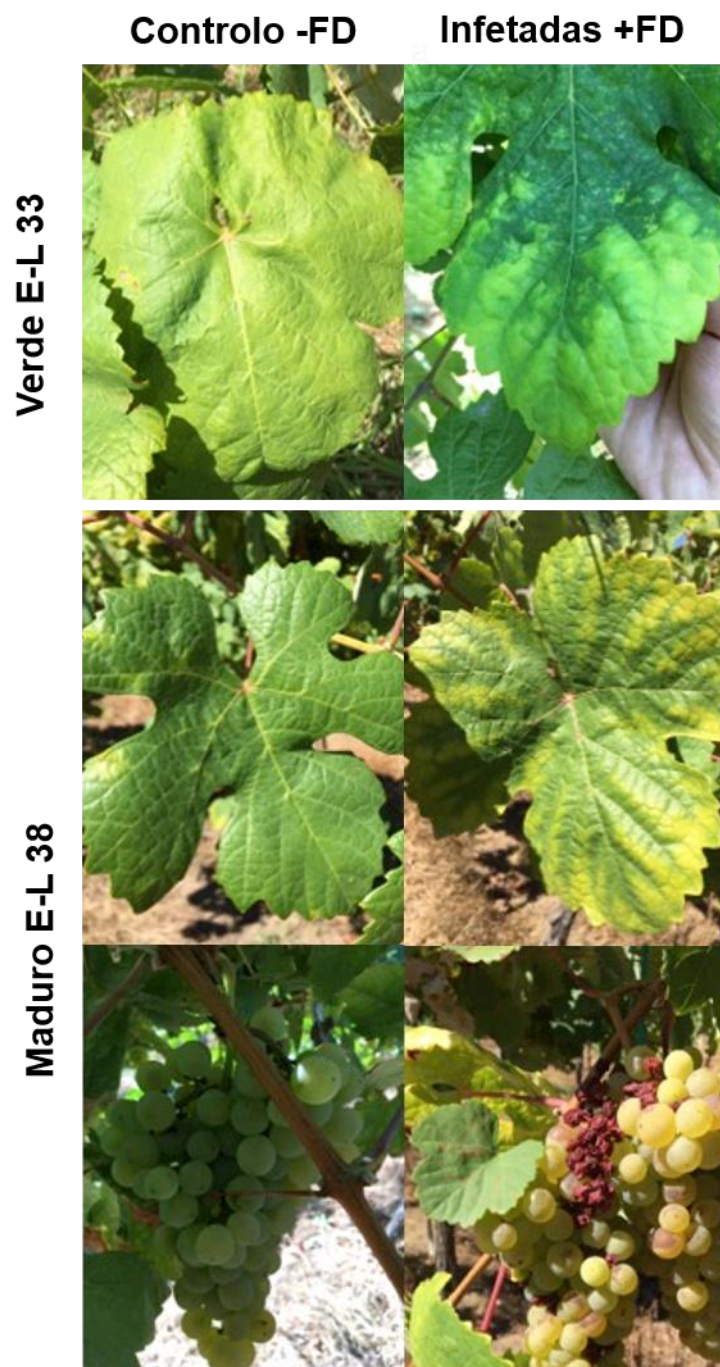


Figura 4.1. Folhas e cachos de videiras da variedade Loureiro controlo (-FD) e infetadas (+FD) em dois estados de desenvolvimento (verde E-L 33 e maduro E-L 38).

Ao contrário das clorofilas, no presente estudo não se observaram alterações no conteúdo em carotenóides totais. Contudo, na variedade Chardonnay infetada por BN, ocorreu um decréscimo de 52% no conteúdo em carotenóides totais (Bertamini e Nedunchezian 2001). Neste contexto, no

nosso laboratório encontram-se em curso estudos mais detalhados de determinação dos carotenóides por técnicas de HPLC-MS.

A observação da diminuição do teor em clorofilas levantou a possibilidade da infecção produzir modificações do metabolismo dos isoprenóides pela modificação ao nível transcricional de alguns genes que codificam enzimas chave desta via. A clorofila *a* é sintetizada a partir das moléculas precursoras geranilgeranil difosfato e fitil-difosfato pela ação das proteínas GGPPS e GGR (Ruiz-Sola., 2016). O geranilgeranil-difosfato (GGPP) e o fitil-difosfato são importantes pontos de ramificação para várias vias de terpenóides a jusante responsáveis pela biossíntese de compostos como: clorofilas, tocoferóis, giberelinas, plastoquinonas, diterpenóides, carotenóides e seus produtos de decomposição (ácido abscísico, estrigolactonas), todos sintetizados em plastídeos (Tholl., 2015). Com efeito, os resultados confirmaram que, em resposta à infecção, ocorreu uma repressão acentuada da expressão de genes que codificam as enzimas geranilgeranil difosfato sintase (*VvGGPPS11*), geranilgeranil reductase (*VvGGR*) e clorofila sintase (*VvCHLSYM*) principalmente em folhas de plantas na fase E-L 38.

Alguns estudos têm mostrado que o aumento nos níveis de hexoses livres nos tecidos pode inibir a fotossíntese por um mecanismo de *feedback* negativo, pela repressão de genes chave envolvidos no processo fotossintético (Sheen, 1990; 1994). Desta forma, não é possível excluir a hipótese que a inibição observada da expressão de genes que codificam proteínas chave para a síntese de clorofila pode ser causada pelo aumento dos níveis de açúcares que foram medidos em folhas de videiras infetadas.

O precursor mais a montante da clorofila é o aminoácido L-acido glutâmico, proveniente da via de síntese da alanina, aspartato e glutamato (Kim et al., 2013; Novák Vanclová et al., 2019), pelo que no presente trabalho foi estudada a expressão do transportador membranar de aminoácidos *VvCAT1* em resposta à infecção. Com efeito, os resultados mostraram que a expressão

relativa deste gene baixou significativamente em folhas de videiras infetadas, o que poderá ter contribuído para a redução dos níveis de ácido glutâmico.

Para além do efeito observado da FD na biossíntese das clorofilas, outros estudos têm mostrado que enzimas chave da fotofosforilação, como a ATPsintase, e do Ciclo de Calvin, como Rubisco e Rubisco activase, podem ser inibidas (Margaria e Palmano., 2011; Margaria et al., 2013; Dermastia et al., 2017).

4.3. Metabolismo dos açúcares é modificado em folhas de plantas infetadas com flavescência dourada

Contrariamente ao efeito observado da infeção sobre os pigmentos fotossintéticos, os resultados mostraram uma acumulação de açúcares redutores em folhas de videira infetadas por FD, principalmente na fase E-L 38. Para além dos açúcares redutores (glicose e frutose) verificou-se uma grande acumulação de sacarose em folhas de videiras infetadas, igualmente mais acentuada na fase E-L 38. Como referido acima, o nível aumentado destes açúcares poderá estar implicado, pelo menos em parte, na repressão de genes chave envolvidos na biossíntese das clorofilas.

Diferentes estudos têm mostrado que a acumulação de açúcares e de outros metabolitos, como proteínas, em videiras infectadas com BN, vírus Pinot gris ou míldio é causada pelo bloqueio dos vasos floémicos devido à deposição de calose nas placas crivosas dos elementos floémicos (Knoblauch et al., 2001; Christensen et al., 2004; Tarquini et al., 2018; Farouk et al., 2017). Este bloqueio foi comprovado recentemente por microscopia electrónica de transmissão nas videiras infetadas com FD usadas no presente estudo (Oliveira et al., 2020), pelo que o aumento dos níveis de açúcares em folhas infetadas pode dever-se, pelo menos em parte, ao bloqueio do movimento dos açúcares das folhas para os órgãos de armazenamento. Contudo, no presente trabalho pretendeu-se ainda testar a hipótese que o aumento dos níveis dos açúcares nas folhas pode ser causado por alterações nos mecanismos de transporte transmembranar e açúcares. Para o efeito,

foi estudada a expressão de genes chave que codificam transportadores membranares em resposta à infecção.

Os resultados mostraram que a expressão de genes que codificam transportadores da membrana plastidial envolvidos no efluxo de açúcares, como o *VvSWEET1*, foi reprimida em resposta à infecção. Ao contrário, estudos anteriores na variedade Modra frankinja mostraram que a flavesccência dourada não afetou a expressão do *VvSWEET1*, bem como dos genes *VvSWEET17a* e *VvSWEET10* (Prezelj et al., 2016). Em concordância com estes resultados, no presente estudo os níveis de transcritos do gene *VvSWEET17a* não sofreram alterações em resposta à infecção.

No estudo referido acima (Prezelj et al., 2016) foi reportado o aumento da expressão do gene *VvSUSY4* que codifica a enzima sacarose sintase em resposta à infecção, o que pode explicar o aumento de sacarose observado no presente estudo na variedade Loureiro. No entanto, para se validar esta hipótese pretendeu-se medir a expressão deste gene no material biológico utilizado, bem como estudar a atividade da enzima em extratos proteicos.

No presente trabalho, para além do *VvSWEET1*, foi também estudada a expressão de outros genes que codificam proteínas exportadores de açúcares da membrana plastidial como o *VvpGT1*, o *VvpGT2* e o *VvpGT4* (Zeng et al., 2014; Noronha et al., 2018), mas os resultados mostraram que os níveis de transcritos não foram substancialmente diferentes entre folhas de plantas infetadas e assintomáticas, exceptuando o *VvpGT1* e *VvpGT2* na fase E-L 33.

O gene *VvGPT2* codifica uma proteína da membrana plastidial que importa glicose-6-fosfato posteriormente usado como precursor da síntese de amido (Noronha et al., 2015). No presente trabalho foi observado que a expressão deste gene em folhas de videiras infetadas diminuiu na fase verde e aumentou na fase E-L 38.

Estudos recentes mostraram que na presença de níveis de CO₂ elevado, ou quando o metabolismo do amido é interrompido, é induzida a expressão do gene *GPT2* que codifica um

antiportador de G6P com Pi da membrana plastidial (Weise et al., 2019). Em *Arabidopsis thaliana* após exposição à luz, a transcrição do *GPT2* aumenta transitoriamente 100 vezes em 2 h (Weise et al., 2019). Em videira foram identificados três variantes de *splicing* para o gene *VvGPT2* (*VvGPT2 α* , *VvGPT2 β* e *VvGPT2 Ω*) mais expressas nas folhas do que em outros órgãos, sugerindo que os transportadores *VvGPT1* e *VvGPT2 Ω* medeiam sugerindo o transporte de glicose-6-Pi através da membrana plastidial (Noronha et al., 2015). Os resultados do presente estudo sugerem que a diminuição dos teores de clorofila em folhas de videiras infetadas com FD, e a consequente clorose, poderá explicar o aumento da expressão do gene *GPT2*, por via do aumento da intensidade de luz que atinge o mesófilo foliar, como observado em *Arabidopsis* (Weise et al., 2019).

O gene *VvPPT* codifica uma proteína transportadora da membrana plastidial que importa fosfoenolpiruvato (PEP), posteriormente utilizado na síntese de ácidos gordos e na via do chiquimato (Bockwoldt., 2019). O transporte deste metabolito para os cloroplastos reveste-se de elevada importância uma vez que a sua síntese ocorre apenas no citosol, resultante da glicólise (Prabhakar et al., 2009). Mutantes de *Arabidopsis* incapazes de expressar o gene *PPT1* evidenciam um fenótipo característico com folhas reticuladas incapazes de produzir antocianinas por não ser possível produzir a fenilalanina, precursor da via dos fenilpropanóides. No presente trabalho observou-se que a expressão do gene *VvPPT* foi consistentemente mais baixa em folhas de plantas infetadas, pelo que a via do chiquimato pode ser comprometida, nomeadamente a síntese da fenilalanina e, mais a jusante, a síntese de compostos secundários, bem como a síntese proteica (Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003; Staehr et al., 2014; Pinard e Mizrachi., 2018).

O gene *VvMEX* codifica um transportador da membrana plastidial que exporta maltose (Niittylä et al., 2004). Durante a noite, na ausência de luz, o amido acumulado nos cloroplastos é desdobrado em glicose e maltose que são transportados para o citosol e posteriormente usados no fabrico da sacarose que é transportada para os tecidos heterotróficos (Noronha et al., 2018).

Mutantes *mex1* de *Arabidopsis* acumulam amido e maltose, resultando num crescimento gravemente retardado (Niittylä et al., 2004; Cho et al., 2010). Mutantes duplos *pgt* e *mex* produzem menos clorofilas. Os autores sugerem que alterações no efluxo dos fotoassimilados do cloroplasto limitam a atividade fotossintética e estão associados com degradação dos cloroplastos (Cho et al., 2010). No presente estudo a expressão do gene diminuiu consistentemente em folhas de videira na fase E-L 38 infetadas com FD, o que, de acordo com estudos acima referidos, pode explicar, pelo menos em parte, as modificações observadas no teor de clorofilas. O padrão de expressão observado dos genes que codificam transportadores membranares de açúcares e de precursores de vias metabólicas como a do chiquimato podem contribuir, pelo menos em parte, para as alterações observadas no padrão de acumulação de açúcares bem como para a forte redução de clorofilas observada em folhas de videira em resposta à infeção.

No presente estudo, foi observado que os níveis de transcritos do gene *VvNTT1* apenas se alteram em folhas de videira infetadas na fase mais precoce do desenvolvimento vegetativo estudada (E-L 33). Este gene codifica um antiportador de ATP com ADP da membrana plastidial (Reiser et al., 2004). Mutantes *ntt1* e *ntt2* de *Arabidopsis* expostos a ciclos de dia curtos e luminosidade reduzida exibiram uma capacidade de defesa aumentada contra stress biótico, formação de zonas necróticas, e aumento dos níveis de H_2O_2 . Ao contrário, em mutantes *ntt1* e *ntt2* / expostos a dias longos este fenótipo não se observa uma vez que a produção de ATP é suficiente no interior do cloroplasto devido à maior taxa fotossintética, pelo que não é necessário o envolvimento do NTT para importar ATP (Schmitz et al., 2010). Outros estudos mostraram que a importação de ATP para o cloroplasto durante a noite é necessária para o controlo da biossíntese de clorofilas, bem como para evitar a formação de lesões e prevenir danos foto-oxidativos (Reinhold et al., 2007). Neste estudo foi ainda observado que mutantes para este gene exibiam maior capacidade de degradação do amido. Com base nestes estudos, o deficiente atempamento das varas de videiras infetadas (sintoma

característico da doença) pode estar relacionado com a redução da síntese de amido provocada pela repressão gene *VvTT1* em resposta à infecção, mas são necessários mais ensaios para confirmar esta hipótese.

4.4. Metabolismo secundário é modificado em videiras infetadas com a flavescência dourada

Os resultados do presente estudo mostraram que folhas de videira da variedade Loureiro infetadas com FD revelaram um aumento de fenólicos totais na fase mais adiantada do desenvolvimento (E-L 38). No entanto, contrariamente ao esperado, não foi observado o aumento da expressão de genes chave do metabolismo secundário como *VvPAL* e *VvSTS* que codificam, respetivamente, a fenilalanina amonia liase e a stilbeno sintase, sugerindo que o aumento dos fenólicos totais pode estar relacionado com a obstrução dos vasos floémicos, como já foi discutido. No entanto, são necessários estudos mais completos, incluindo estudos de expressão de outros genes e isoformas do metabolismo secundário, bem como estudos de atividade enzimática, para descartar completamente a hipótese que o metabolismo secundário não é estimulado na casta Loureiro em resposta à infecção. Com efeito, em estudos anteriores, foi observado que as infeções por fitoplasmas produzem modificações nas vias do metabolismo secundário de várias espécies vegetais, incluindo a videira, nomeadamente pela estimulação da via de síntese dos fenilpropanóides (Mardi et al., 2015; Ye et al., 2017; Dermastia et al., 2019). Por exemplo, em videiras da variedade Chardonnay infetadas por Bois Noir (BN), observou-se um aumento da expressão da *PAL* (Hren et al., 2009).

Independentemente dos mecanismos envolvidos no aumento observado nos níveis de fenólicos totais em folhas da variedade Loureiro, este resultado vai de encontro ao descrito na literatura (Margaria et al., 2014; Prezelj et al., 2016; Dermastia et al., 2019; Bertazzon et al., 2019), pelo que o presente estudo contemplou ainda uma análise mais detalhada dos diferentes

compostos, por métodos analíticos mais precisos, como HPLC-DAD, tendo sido identificados três famílias de compostos, os ácidos hidroxicinâmicos, os flavonóis e flavan-3-ols. De modo geral verificou-se um decréscimo do ácido cafeoiltartárico e do ácido cumaroiltartárico na fase E-L 33 e um aumento na fase E-L 38. Verificou-se ainda um aumento generalizado dos flavonóis (quercetinas) e flavan-3-ols (catequinas) identificados nas duas fases de desenvolvimento.

Estes resultados vão de encontro ao descrito na literatura onde se observou que a infecção por BN e FD está associada com um aumento dos ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e flavan-3-ols em folhas de videira, embora este aumento varie de acordo com o estado de desenvolvimento (Dermastia et al., 2017). Em folhas da variedade Chardonnay, ocorreu um aumento nos níveis de campeferol-3-O-glicosido e de quercetinas na fase E-L 38 (Dermastia et al., 2017).

A síntese de compostos secundários está relacionada com a resposta a agressões ambientais, como herbivoria, stresse abiótico e biótico (Teixeira et al., 2013; 2014; Goufo et al., 2019). Por exemplo, em videiras infetadas por ESCA os níveis de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis aumentam substancialmente (Lima et al., 2017). Igualmente em videira tem sido amplamente reportado que o aumento da síntese de metabolitos secundários em plantas infetadas com fitoplasmas representa um mecanismo de resposta da planta à infecção de modo a minimizar os seus efeitos (Margaria et al., 2014; Prezelj et al., 2016; Bertazzon et al., 2019). Tratando-se de um tema tão relevante do ponto de vista científico e agronómico, este trabalho merece estudos mais aprofundados, como referido acima, que se encontram em curso no laboratório de Biologia Vegetal.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A flavesccência dourada (FD) é uma doença da videira causada pelo fitoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis* e propagada pelo vetor cicadelídeo *Sacaphoideus titanus*. Como referido na Introdução, a doença foi identificada em diversas áreas vitivinícolas da Europa, incluindo em Portugal onde se encontra largamente disseminada nas vinhas da região norte do país, nomeadamente na vinha que foi alvo de estudo do presente trabalho. Uma vez que tratamentos curativos ainda não se encontram à disposição dos produtores, a utilização de testes de diagnóstico sensíveis, como o utilizado no presente estudo, baseado na técnica de PCR em tempo real, torna-se fundamental para o seu controlo. Contudo, ainda que este método se afigure como altamente sensível e reprodutível pode também gerar falsos negativos, como observado no presente trabalho, dependendo do estado de desenvolvimento da planta e do grau de proliferação da infeção nos diferentes tecidos. Neste sentido, o presente trabalho beneficiou de estudos anteriores desenvolvidos no âmbito da tese de mestrado de Áurea Gomes intitulada “Estudos bioquímicos e moleculares sobre a flavesccência dourada com vista à sua deteção precoce em videira”, concluída em 2016 no Departamento de Biologia da Universidade do Minho (Gomes, 2016), em colaboração com a Estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG). Na EVAG foi possível identificar algumas plantas sintomáticas da variedade Loureiro e otimizar o protocolo de diagnóstico por PCR em tempo real, contudo, o trabalho foi muito dificultado em termos de aplicação de abordagens bioquímicas e moleculares, pela necessidade de se eliminarem, de imediato, as plantas sintomáticas, de acordo com o estipulado pela DGAV. Ainda assim, foi possível observar uma redução do conteúdo em clorofilas das folhas e um aumento dos níveis de açúcar, incluindo de frutose e de sacarose, tal como observado no presente trabalho. 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.

Uma conclusão semelhante foi obtida no presente trabalho de tese em videiras da variedade Loureiro da Quinta do Corvo (Fafe). Como referido anteriormente, estas respostas fisiológicas das folhas encontram-se bem documentadas na literatura, pelo que, nesta dimensão, o resultados do presente trabalho não são completamente inovadores.

O trabalho da presente tese de mestrado beneficiou também da colaboração em curso com os grupos de investigação liderados pela Prof. Susana Carvalho da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, e pela Prof. Marta Vasconcelos da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. Em particular, porque foi possível estudar plantas de uma vinha comercial que já tinham sido diagnosticadas previamente como portadoras da doença. Importa salientar que o cicadelídeo *Sacaphoideus titanus*, vetor da doença, tem sido eficazmente controlado nesta vinha, pelo que não foi necessário proceder ao abate da mesma, uma vez que não há qualquer risco de propagação da doença.

Encontram-se bem identificados os sintomas de videiras infetadas pela FD, nomeadamente ao nível do desenvolvimento vegetativo reduzido, traduzido no atraso ou ausência do abrolhamento, crescimento reduzido, redução da quantidade dos gomos florais, atraso ou ausência de atempamento das varas, ou o amarelecimento (variedades brancas) e avermelhamento (variedades tintas) das folhas, entre outros, como apresentado na Introdução. As modificações bioquímicas que ocorrem nas folhas relativamente ao aumento dos níveis de açúcares e de compostos fenólicos, que podem decorrer do bloqueio dos vasos floémicos ou de alterações ao nível da expressão de genes/atividades enzimáticas, também se encontram razoavelmente caracterizadas, como descrito acima. Contudo, no presente trabalho foi estudada a expressão de outros genes envolvidos, por exemplo, no transporte de açúcares ao nível da membrana do plastídeo (*VvpGT*), ou do gene *VvPPT* que codifica o transportador plastidial de fosfoenolpiruvato que é um precursor muito importante da via do chiquimato, que, por sua vez, alimenta a via dos fenilpropanóides. Este trabalho enquadra-se

nos objetivos do projeto FCT BerryPlastid (PTDC-BIA-FBT/28165/2017) no âmbito da tarefa 5 que visa em compreender as alterações metabólicas que ocorrem no plastídio das folhas de videira infetadas com FD onde está descrita uma sobre-acumulação de fenólicos, como observado no presente estudo, no entanto a tarefa ainda não está concluída.

Um dos aspetos mais inovadores do presente estudo consistiu na formulação da hipótese que a diminuição observada no teor de clorofila em folhas infetadas é mediada pela repressão de genes-chave envolvidos na biossíntese de clorofilas. Com efeito, os resultados mostraram que a redução das clorofilas poderá ser controlada ao nível transcricional com repressão de genes como o *VvGGPPS11* e *VvGGR*, envolvidos na síntese de precursores das clorofilas e a repressão do gene *VvCHLSYN* diretamente envolvido na síntese da clorofila *a*.

Os isoprenoides como ubiquinona (UQ) e plastoquinona (PQ) são transportadores de eletrões que atuam na fosforilação oxidativa e na fotossíntese, respectivamente (Ducluzeau et al., 2012). Da mesma forma, os tocoferóis, em cooperação com o ciclo das xantofilas, protegem o PSII da foto-inibição e os lípidos da membrana da foto-oxidação (Kanehisa et al., 2000; Havaux et al., 2014). No âmbito do projeto acima identificado estão em curso estudos de metabolómica e transcriptómica dirigida incidindo nas vias de síntese das clorofilas e dos seus precursores, bem como a avaliação do seu efeito nas vias de síntese de compostos incluindo carotenóides, tocóferóis e ubiquinonas que permitirão compreender o efeito da infeção nos mecanismos de foto-inibição e foto-oxidação do aparelho fotossintético. Os resultados já obtidos abrem excelentes perspectivas se compreender com mais detalhe as respostas dos aparelho fotossintético à infeção pelo fitoplasma da FD.

6. Referências

6. Referências

- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., ... & Pecchioni, N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176(6), 792-804.
- Alma, A., Lessio, F., & Nickel, H. (2019). Insects as phytoplasma vectors: ecological and epidemiological aspects. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II* (pp. 1-25). Springer, Singapore.
- Al-Saddik, H., Simon, J. C., & Cointault, F. (2019). Assessment of the optimal spectral bands for designing a sensor for vineyard disease detection: the case of 'dorée'. *Precision Agriculture*, 20(2), 398-422.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., & Boudon-Padieu, E. (2001). Flavescence dorée in France and Italy-Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40(2), 79-86.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., ... & Foissac, X. (2007). Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied Environmental Microbiology*, 73(12), 4001-4010.
- Arroyo-García, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M. A., Arnold, C., ... & Ibanez, J. (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707-3714.
- Bagnoli, B., & Gargani, E. (2011). Survey on *Scaphoideus titanus* egg distribution on grapevine. *IOBC/WPRS Bull*, 67, 233-237.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., ... & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3682-3696.

- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4019-4026.
- Bertaccini, A., & Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 355-378.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5(12), 1763.
- Bertamini, M., & Nedunchezian, N. (2001). Effects of phytoplasma [stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, 39(1), 119-122.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F., & Grando, M. S. (2002). Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(6), 357-366.
- Bertazzon, N., Bagnaresi, P., Forte, V., Mazzucotelli, E., Filippin, L., Guerra, D., ... & Angelini, E. (2019). Grapevine comparative early transcriptomic profiling suggests that Flavescence dorée phytoplasma represses plant responses induced by vector feeding in susceptible varieties. *BMC Genomics*, 20(1), 526.
- Bockwoldt, M., Heiland, I., & Fischer, K. (2019). The evolution of the plastid phosphate translocator family. *Planta*, 250(1), 245-261.
- Botti, S., & Bertaccini, A. (2007). Grapevine yellows in northern Italy: molecular identification of Flavescence dorée phytoplasma strains and of Bois noir phytoplasmas. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2325-2330.
- Boubakri, H., Hadj-Brahim, A., Schmitt, C., Soustre-Gacougnolle, I., & Mliki, A. (2015). Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(4), 261-274.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., ... & Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid

- pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, 13(1), 31.
- Boudon-Padieu, E. (2000). Cicadelle vectrice de la Flavescence dorée *Scaphoideus titanus* Ball, 1932. *Ravageurs de la Vigne*, 1st edn. Féret, Bordeaux, 110-120.
- Bressan, A., Larrue, J., & Padieu, E. B. (2006). Patterns of phytoplasma-infected and infective *Scaphoideus titanus* leafhoppers in vineyards with high incidence of Flavescence dorée. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(1), 61-69.
- Castro, I., Pinto-Carnide, O., Ortiz, J. M., & Martin, J. P. (2013). Chloroplast genome diversity in Portuguese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Molecular Biotechnology*, 54(2), 528-540.
- Cho, M. H., Lim, H., Shin, D. H., Jeon, J. S., Bhoo, S. H., Park, Y. I., & Hahn, T. R. (2011). Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 190(1), 101-112.
- 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*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589-6601.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526-535.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11), 1175-1184.
- Chuche, J., & Thiéry, D. (2012). Egg incubation temperature differently affects female and male hatching dynamics and larval fitness in a leafhopper. *Ecology and Evolution*, 2(4), 732-739.
- Chuche, J., & Thiéry, D. (2014). Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 381-403.
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J. M., Blumwald, E., Chaves, M. M., & Gerós, H. (2015). Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 889-906.

- Coombe, B. G. (1995). Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 104-110.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E. (2016). Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3), 504-516.
- Dermastia, M., Bertaccini, A., Constable, F., & Mehle, N. (2017). *Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents: biology and detection*. Springer.
- Dermastia, M., Kube, M., & Šeruga-Musić, M. (2019). Transcriptomic and Proteomic Studies of Phytoplasma-Infected Plants. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-III* (pp. 35-55). Springer, Singapore.
- Dermastia, M., Nikolic, P., Chersicola, M., & Gruden, K. (2015). Transcriptional profiling in infected and recovered grapevine plant responses to '*Candidatus Phytoplasma solani*'. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1s), S123-S124.
- DGAV (2013). Plano de ação nacional para o controlo da Flavescência dourada da Videira, janeiro 2013.
- DRAPN (2019). Textos de divulgação técnica da Estação de Avisos de Entre Douro e Minho n° 04/2019/ julho (reedição).
- Eriksson, A., Anfora, G., Lucchi, A., Lanzo, F., Virant-Doberlet, M., & Mazzoni, V. (2012). Exploitation of insect vibrational signals reveals a new method of pest management. *Plos One*, 7(3), e32954.
- Ermacora, P., & Osler, R. (2019). Symptoms of Phytoplasma Diseases. In *Phytoplasmas* (pp. 53-67). Humana Press, New York, NY.
- Europe, O. (2012). Hot water treatment of grapevine to control Grapevine flavescence dorée phytoplasma. *EPPO Bull*, 42, 490-492.
- Eveillard, S., Jollard, C., Labroussaa, F., Khalil, D., Perrin, M., Desqué, D., ... & Foissac, X. (2016). Contrasting susceptibilities to Flavescence dorée in *Vitis vinifera*, rootstocks and wild *Vitis* species. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1762.

- Farouk, S., Belal, B. E. A., & El-Sharkawy, H. H. A. (2017). The role of some elicitors on the management of Roumy Ahmar grapevines downy mildew disease and it's related to inducing growth and yield characters. *Scientia Horticulturae*, 225, 646-658.
- Gai, Y. P., Han, X. J., Li, Y. Q., Yuan, C. Z., MO, Y. Y., Guo, F. Y., ... & Ji, X. L. (2014). Metabolomic analysis reveals the potential metabolites and pathogenesis involved in mulberry yellow dwarf disease. *Plant, Cell & Environment*, 37(6), 1474-1490.
- Gainza-Cortés, F., Pérez-Díaz, R., Pérez-Castro, R., Tapia, J., Casaretto, J. A., González, S., ... & González, E. (2012). Characterization of a putative grapevine Zn transporter, VvZIP3, suggests its involvement in early reproductive development in *Vitis vinifera* L. *BMC Plant Biology*, 12(1), 111.
- Gajardo, A., Fiore, N., Prodan, S., Paltrinieri, S., Botti, S., Pino, A. M., ... & Bertaccini, A. (2009). Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. *Plant Disease*, 93(8), 789-796.
- Gomes, Á. L. C. (2016). Estudos bioquímicos e moleculares sobre a Flavescência Dourada com vista à sua detecção precoce em videira (Master dissertation).
- Goufo, P., Marques, A. C., & Cortez, I. (2019). Exhibition of Local but Not Systemic Induced Phenolic Defenses in *Vitis vinifera* L. Affected by Brown Wood Streaking, Grapevine Leaf Stripe, and Apoplexy (Esca Complex). *Plants*, 8(10), 412.
- Guo, W. J., Nagy, R., Chen, H. Y., Pfrunder, S., Yu, Y. C., Santelia, D., ... & Martinoia, E. (2014). SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology*, 164(2), 777-789.
- Havaux, M., & García-Plazaola, J. I. (2014). Beyond non-photochemical fluorescence quenching: the overlapping antioxidant functions of zeaxanthin and tocopherols. In *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria* (pp. 583-603). Springer, Dordrecht.
- 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 Pathology*, 56(5), 785-796.

- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnkar, M., ... & Gruden, K. (2009). 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10(1), 460.
- Junqueira, A., Bedendo, I., & Pascholati, S. (2004). Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(4), 181-185.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Kim, S., Schlicke, H., Van Ree, K., Karvonen, K., Subramaniam, A., Richter, A., ... & Braam, J. (2013). *Arabidopsis* chlorophyll biosynthesis: an essential balance between the methylerythritol phosphate and tetrapyrrole pathways. *The Plant Cell*, 25(12), 4984-4993.
- Knoblauch, M., Peters, W. S., Ehlers, K., & van Bel, A. J. (2001). Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *The Plant Cell*, 13(5), 1221-1230.
- Landi, L., & Romanazzi, G. (2011). Seasonal variation of defense-related gene expression in leaves from Bois noir affected and recovered grapevines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6628-6637.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C., & Caudwell, A. (1994). Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(3), 285-293.
- Leon, R., Santamaria, J. M., Alpizar, L., Escamilla, J. A., & Oropeza, C. (1996). Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytologist*, 134(2), 227-234.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, 591-592.
- Lima, M. R., Felgueiras, M. L., Cunha, A., Chicau, G., Ferreres, F., & Dias, A. C. (2017). Differential phenolic production in leaves of *Vitis vinifera* cv. Alvarinho affected with esca disease. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 45-52.
- MAMAOT (2012). Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Portaria n.º 380/2012 de 22 de novembro.

- Mardi, M., Farsad, L. K., Gharechahi, J., & Salekdeh, G. H. (2015). In-depth transcriptome sequencing of Mexican lime trees infected with *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*. *Plos One*, 10(7), e0130425.
- Margaria, P., & Palmano, S. (2011). Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics*, 11(2), 212-224.
- Margaria, P., Abbà, S., & Palmano, S. (2013). Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. *BMC genomics*, 14(1), 38.
- Margaria, P., Ferrandino, A., Caciagli, P., Kedrina, O., Schubert, A., & Palmano, S. (2014). Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, Cell & Environment*, 37(9), 2183-2200.
- Martin, L., Fontaine, F., Castaño, F. J., Songy, A., Roda, R., Vallet, J., & Ferrer-Gallego, R. (2019). Specific profile of Tempranillo grapevines related to Esca-leaf symptoms and climate conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 575-587.
- 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-Geilweilerhof*, 41(2), 99-102.
- Musetti, R., Buxa, S. V., De Marco, F., Loschi, A., Polizzotto, R., Kogel, K. H., & van Bel, A. J. (2013). Phytoplasma-triggered Ca²⁺ influx is involved in sieve-tube blockage. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(4), 379-386.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, 303(5654), 87-89.
- 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(4), 909-920.
- Noronha, H., Silva, A., Dai, Z., Gallusci, P., Rombolà, A. D., Delrot, S., & Gerós, H. (2018). A molecular perspective on starch metabolism in woody tissues. *Planta*, 248(3), 559-568.

- Novák, V. A., Zoltner, M., Kelly, S., Soukal, P., Záhonová, K., Füssy, Z., ... & Field, M. C. (2019). Metabolic quirks and the colourful history of the *Euglena gracilis* secondary plastid. *The New Phytologist*.
- OIV (International Organisation of Vine and Wine). (2018). Statistical Report on World Vitiviniculture.
- OIV (International Organisation of Vine and Wine). (2019). Statistical Report on World Vitiviniculture.
- Oliveira, M. J. R. A., Roriz, M., Vasconcelos, M. W., Bertaccini, A., & Carvalho, S. M. (2019). Conventional and novel approaches for managing “flavescence dorée” in grapevine: knowledge gaps and future prospects. *Plant Pathology*, 68(1), 3-17.
- Oliveira, M. J., Castro, S., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Sottomayor, M., Santos, C. S., ... & Carvalho, S. M. (2020). “Flavescence dorée” impacts growth, productivity and ultrastructure of *Vitis vinifera* plants in Portuguese “Vinhos Verdes” region. *Scientia Horticulturae*, 261, 108742.
- Pap, D., Riaz, S., Dry, I. B., Jermakow, A., Tenschler, A. C., Cantu, D., ... & Walker, M. A. (2016). Identification of two novel powdery mildew resistance loci, Ren6 and Ren7, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biology*, 16(1), 170.
- Pinard, D., & Mizrachi, E. (2018). Unsung and understudied: plastids involved in secondary growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 42, 30-36.
- Prabhakar, V., Löttgert, T., Gigolashvili, T., Bell, K., Flügge, U. I., & Häusler, R. E. (2009). Molecular and functional characterization of the plastid-localized phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 583(6), 983-991.
- Prezelj, N., Covington, E., Roitsch, T., Gruden, K., Fagner, L., Weckwerth, W., ... & Dermastia, M. (2016). Metabolic consequences of infection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. “Modra frankinja” with Flavescence Dorée phytoplasma. *Frontiers in Plant Science*, 7, 711.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M., & Dermastia, M. (2013). Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62(4), 760-766.
- Quartau, J. A., Guimaraes, J. M., & André, G. (2001). On the occurrence in Portugal of the nearctic *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae), the natural vector of the grapevine “Flavescence dorée”(FD). *IOBC WPRS Bulletin*, 24(7), 273-276.
- Ramos, M. J. N., Coito, J. L., Silva, H. G., Cunha, J., Costa, M. M. R., & Rocheta, M. (2014). Flower development and sex specification in wild grapevine. *BMC Genomics*, 15(1), 1095.

- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(1), 27.
- Reinhold, T., Alawady, A., Grimm, B., Beran, K. C., Jahns, P., Conrath, U., ... & Neuhaus, H. E. (2007). Limitation of nocturnal import of ATP into *Arabidopsis* chloroplasts leads to photooxidative damage. *The Plant Journal*, 50(2), 293-304.
- Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W., & Neuhaus, H. E. (2004). Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(3), 3524-3536.
- Riolo, P., Minuz, R. L., Landi, L., Nardi, S., Ricci, E., Righi, M., & Isidoro, N. (2014). Population dynamics and dispersal of *Scaphoideus titanus* from recently recorded infested areas in central-eastern Italy. *Bulletin of Insectology*, 67(1), 99-107.
- Ruiz-Sola, M. Á., Coman, D., Beck, G., Barja, M. V., Colinas, M., Graf, A., ... & Gruissem, W. (2016). *Arabidopsis* GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 11 is a hub isozyme required for the production of most photosynthesis-related isoprenoids. *New Phytologist*, 209(1), 252-264.
- Rusjan, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2015). Phenolic responses in 1-year-old canes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 123-134.
- Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikulič-Petkovšek, M., & Veberič, R. (2012). Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 231-237.
- Sannakki, S. S., Rajpurohit, V. S., Nargund, V. B., & Kulkarni, P. (2013, July). Diagnosis and classification of grape leaf diseases using neural networks. In 2013 Fourth International Conference on Computing, Communications and Networking Technologies (ICCCNT) (pp. 1-5). IEEE.
- Santi, S., De Marco, F., Polizzotto, R., Grisan, S., & Musetti, R. (2013). Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 4, 171.

- Santi, S., Grisan, S., Pierasco, A., De Marco, F., & Musetti, R. (2013). Laser microdissection of grapevine leaf phloem infected by stolbur reveals site-specific gene responses associated to sucrose transport and metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 36(2), 343-355.
- Schmitz, G., Reinhold, T., Göbel, C., Feussner, I., Neuhaus, H. E., & Conrath, U. (2010). Limitation of nocturnal ATP import into chloroplasts seems to affect hormonal crosstalk, prime defense, and enhance disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(12), 1584-1591.
- Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, 2(10), 1027-1038.
- Sheen, J. (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Research*, 39(3), 427-438.
- Sousa, E. (2014). Doença da Flavescência dourada em videira. *Boletim Técnico*, inav.
- Sousa, E., Baltazar, C., Bianco, P., Casati, P., Cardoso, F., Xavier, A. & Carlos, C. (2007). Detecção do fitoplasma Flavescence dorée em videira e no seu vetor (*Scaphoideus titanus* Ball) em Portugal. 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo. Évora. 23-25 maio, pp 86-93
- Sousa, E., Cardoso, F., Mimoso, M., Sá, C., & Teixeira, K. (2011). The complex 'flavescence dorée' phytoplasma/ *Scaphoideus titanus* in Portugal. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(1), 51-53.
- Staeher, P., Löttgert, T., Christmann, A., Krueger, S., Rosar, C., Rolčík, J., ... & Flügge, U. I. (2014). Reticulate leaves and stunted roots are independent phenotypes pointing at opposite roles of the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator defective in *cue1* in the plastids of both organs. *Frontiers in Plant Science*, 5, 126.
- Steffek, R., Reisenzein, H., & Zeisner, N. (2007). Analysis of the pest risk from Grapevine flavescence dorée phytoplasma to Austrian viticulture. *EPPO bulletin*, 37(1), 191-203.
- Streatfield, S. J., Weber, A., Kinsman, E. A., Häusler, R. E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., ... & Chory, J. (1999). The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *The Plant Cell*, 11(9), 1609-1621.
- Tarquini, G., Ermacora, P., Bianchi, G. L., De Amicis, F., Pagliari, L., Martini, M., ... & Musetti, R. (2018). Localization and subcellular association of Grapevine Pinot Gris Virus in grapevine leaf tissues. *Protoplasma*, 255(3), 923-935.

- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., & Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Teixeira, A., Martins, V., Noronha, H., Eiras-Dias, J., & Gerós, H. (2014). The first insight into the metabolite profiling of grapes from three *Vitis vinifera* L. cultivars of two controlled appellation (DOC) regions. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4237-4254.
- Terral, J. F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., ... & Tardy, C. (2009). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105(3), 443-455.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In *Biotechnology of isoprenoids* (pp. 63-106). Springer, Cham.
- Torres, E., Batlle, A., Lavina, A., Bech, J., Bertaccini, A., & Sousa, E. (2014). Review of occurrence of phytoplasmas in Spain, Portugal and Malta. In *COST Action FA0807 Final Meeting* (p. 14).
- Tothova, M., Bokor, P., & Cagáň, Ľ. (2015). The first detection of leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera, Cicadellidae) in Slovakia. *Plant Protection Science*, 51(2), 88-93.
- Vitali, M., Chitarra, W., Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C., Gullino, M. L., ... & Lovisolo, C. (2013). Flavescence dorée phytoplasma deregulates stomatal control of photosynthesis in *Vitis vinifera*. *Annals of Applied Biology*, 162(3), 335-346.
- Voll, L., Häusler, R. E., Hecker, R., Weber, A., Weissenböck, G., Fiene, G., ... & Flügge, U. I. (2003). The phenotype of the *Arabidopsis* cue1 mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *The Plant Journal*, 36(3), 301-317.
- Weise SE, Liu T, Childs KL, Preiser AL, Katulski HM, Perrin-Porzondek C and Sharkey TD (2019) Transcriptional Regulation of the Glucose-6-Phosphate/Phosphate Translocator 2 Is Related to Carbon Exchange Across the Chloroplast Envelope. *Frontiers in Plant Science* 10:827.
- Ye, X., Wang, H., Chen, P., Fu, B., Zhang, M., Li, J., ... & Feng, J. (2017). Combination of iTRAQ proteomics and RNA-seq transcriptomics reveals multiple levels of regulation in phytoplasma-infected *Ziziphus jujuba* mill. *Horticulture Research*, 4, 17080.

- Zeng, L., Yi, Y., Tang, H., & Wang, J. (2014). VvpGLT, a Grapevine Gene Encoding for a Plastidic Localized Glucose Transporter. In Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012) (pp. 1507-1515). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zini, E., Dolzani, C., Stefanini, M., Gratl, V., Bettinelli, P., Nicolini, D., ... & Vezzulli, S. (2019). R-Loci arrangement versus downy and powdery mildew resistance level: A vitis Hybrid survey. International Journal of Molecular Sciences, 20(14), 3526.