

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito das altas temperaturas de verão observadas no Pólo de
Conservação da Videira de Pegões sobre a concentração do
vírus do enrolamento foliar da videira tipo 3 (GLRaV3) em
seis castas.**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica

Joana Correia Campos

Orientadoras: Ana Maria Nazaré Pereira

Elsa Maria Félix Gonçalves



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito das altas temperaturas de verão observadas no Pólo de
Conservação da Videira de Pegões sobre a concentração do
vírus do enrolamento foliar da videira tipo 3 (GLRaV3) em
seis castas.**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica

Joana Correia Campos

Orientadoras: Ana Maria Nazaré Pereira

Elsa Maria Félix Gonçalves

Composição do júri:

Virgílio Alexandre Cardoso e Falco da Costa

Ana Maria Araújo de Beja neves Nazaré Pereira

Maria Isabel Mendes Guerra Marque Cortez

Vila Real, 2019

“As doutrinas apresentadas neste trabalho são
da exclusiva responsabilidade do autor.”

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, às minhas orientadoras Professora Doutora Ana Maria Nazaré Pereira e Professora Doutora Elsa Maria Félix Gonçalves por me terem proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho. Por todo o apoio e orientação, pela paciência e compreensão que demonstraram comigo ao longo deste processo. Quero agradecer também ao Professor Doutor Antero Martins, presidente da PORVID, por ter apoiado este trabalho e depositado em mim a confiança para a sua concretização.

Ao Sr. Carlos Martins, pela paciência e disponibilidade para me ajudar no período em que trabalhei no Laboratório de Fitopatologia da UTAD. À D. Ana Macedo pela boa disposição e palavras amigas que tinha para dar todos os dias.

Um grande agradecimento aos meus amigos, em especial à Catarina e à Mara, bem como aos meus afilhados, por me receberem sempre que eu precisei.

Agradeço com todo o coração ao Francisco, foste e serás sempre um grande apoio. Obrigada por nunca deixares de acreditar em mim.

Por fim quero agradecer aos meus familiares. Às minhas tias Sandra e Paula por me fazerem sentir um bocadinho mais em casa nos fins-de-semana em que as visitava no Porto. Por me apoiarem incondicionalmente, agradeço aos meus irmãos Vasco, Linda e em especial à Sofia, onde encontro um exemplo, uma inspiração. Por todos os sacrifícios, por me mostrarem o verdadeiro significado da palavra “lutar”, por me ensinarem a amar, por se orgulharem sempre de mim, eu agradeço aos meus pais Vítor e Tinina.

Resumo

A vinha pode ser alvo de várias pragas e doenças parasitárias, entre elas diversas viroses. Atualmente, estão identificados vários vírus responsáveis por algumas dessas patologias da videira embora apenas alguns afetem a sua produtividade, maturação e longevidade. A doença do enrolamento foliar da videira é a virose que está mais expandida pelas vinhas portuguesas, sendo *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV3) o mais difundido.

Em Pegões está o Pólo de Conservação da Diversidade da Videira da Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira (PORVID), associação esta responsável pela seleção clonal das videiras em Portugal. Alguns clones localizados nesse Pólo Experimental foram testados por ELISA em 2013 para o GLRaV-3 tendo resultados positivos. Nos anos seguintes os mesmos clones não manifestaram sintomas, pelo que com este estudo pretende-se analisar se essas videiras continuam infetadas por GLRaV-3 de modo a verificar se as elevadas temperaturas de verão na região influenciam a presença do vírus na planta e respetiva manifestação dos sintomas da doença.

No verão de 2017 fez-se acompanhamento visual dos sintomas das plantas de vários clones em seis castas e, em Setembro, fez-se a recolha das amostras e os testes ELISA de modo a analisar a concentração de GLRaV-3. Após a análise dos resultados mostrou-se conveniente fazer uma nova visita ao campo experimental em Pegões e tiraram-se novas fotografias a alguns clones estudados. Foi feito um estudo comparativo entre os resultados obtidos nos testes ELISA realizados em 2013 e em 2017, bem como entre os resultados de 2017 e a situação sintomática observada.

Os resultados evidenciaram a existência de plantas isentas de GLRaV-3 em 2017 que, no entanto, estavam infetadas por este vírus em 2013. Nas plantas que continuaram positivas também houve várias situações em que os sintomas não se manifestaram, apesar da infeção pelo GLRaV-3 permanecer. Estes parâmetros sugerem que as temperaturas elevadas durante o verão em Pegões possam inativar ou até eliminar o vírus.

Palavras-chave: GLRaV; PORVID; Seleção Clonal; Pintosa; Batoca; Esganoso; Lameiro; Espadeiro; Padeiro; “termoterapia natural”.

Abstract

Vineyards are the target to many pests and parasitic diseases, among them several viruses. There are currently identified several viruses responsible for some of these grapevine pathologies, although only a few affect their productivity, maturation, and longevity. The grapevine leafroll disease is the most expanded virus in the portuguese vines, being *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) the most widespread.

In Pegões is located the Pole of Conservation of the Vineyard of the “Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira” (PORVID), which is responsible for the clonal selection of grapevine in Portugal. Some of the clones in this experimental pole were submitted to ELISA in 2013 for the GLRaV-3 with positive results for the virus. During the following years the same clones showed no symptoms, so this study intends to analyze if these vines are still infected with GLRaV-3 in order to verify if the high summer temperatures in the region influence the presence of the virus in the plant and the manifestation of the disease symptoms.

In the summer of 2017, plant symptoms were visually monitored in several clones from six grapevine varieties and, in September, the samples collected and ELISA tests for GLRaV-3 were carried out. After the analysis of the results, it was convenient to make a new visit to the experimental field in Pegões and new photos were taken to some studied clones. A comparative study was carried out between the results obtained in ELISA tests performed in 2013 and in 2017, as well as, between the results of 2017 and the symptomatic situation observed.

The results showed the existence of GLRaV-3-free plants in 2017 that, however, were infected by this virus in 2013. In the plants that remained positive there were also several cases in which the symptoms were not present, although the GLRaV-3 infection still remains. These parameters suggest that summer temperatures in Pegões can inactivate or even eliminate the virus.

Key-words: GLRaV; PORVID; Clonal Selection; Pintosa; Batoca; Esganoso; Lameiro; Espadeiro; Padeiro; “natural thermotherapy”.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice de Figuras	VI
Introdução	1
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica	2
1.1. Seleção clonal da videira em Portugal.....	2
1.2. Caracterização das castas estudadas.....	5
1.2.1. Pintosa	5
1.2.2. Batoca	6
1.2.3. Esganoso.....	6
1.2.4. Lameiro.....	7
1.2.5. Espadeiro	7
1.2.6. Padeiro	8
1.3. Os vírus da videira.....	9
1.4. Doença do enrolamento foliar da videira	12
1.4.1. Sintomatologia.....	12
1.4.2. Agentes causais e classificação	14
1.4.3. Impacto e prejuízos.....	15
1.4.4. Disseminação.....	16
1.4.5. Estratégias de proteção	18
1.5. Métodos de diagnóstico para os vírus da videira.....	19
Capítulo 2 – Material e Métodos	23
2.1 – Material vegetal e condições de crescimento	23
2.2 – Acompanhamento de sintomas.....	24

2.3 – Teste DAS-ELISA	24
2.4 – Metodologia para análise dos resultados	25
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	27
3.1 – Estado sanitário dos clones em 2013 e em 2017	27
3.2 – Relação entre estado sanitário e desenvolvimento de sintomas	32
3.3 – Concentração de vírus na zona apical e basal das plantas	33
Capítulo 4 – Conclusões	36
Referências bibliográficas	38
ANEXO	43

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema da metodologia de seleção clonal em Portugal.	5
Figura 2 - Cacho da casta Píntosa.....	6
Figura 3 - Cacho da casta Batoca	6
Figura 4 - Cacho da casta Esganoso.	7
Figura 5 - Cacho da casta Lameiro	7
Figura 6 - Cacho da casta Espadeiro	8
Figura 7 - Cacho da casta Padeiro	9
Figura 8. Sintomas típicos da doença do enrolamento foliar da videira. (A) Casta tinta de <i>Vitis vinífera</i> , Cabernet Franc; (B) Casta branca de <i>Vitis vinífera</i> , Chardonnay.	12
Figura 9. Amostras recolhidas, sendo A o conjunto de folhas com pecíolo da zona basal do sarmento, e B a vara não atempada com folhas na extremidade apical.....	25

Índice de Quadros

Quadro 1 Classificação taxonómica dos vírus da videira.....	10
Quadro 2 - Classificação taxonómica de GLRaV e organização genética.....	15
Quadro 3- Vetores conhecidos da doença do enrolamento foliar da videira.....	17
Quadro 4 – Clones testados por ELISA para GLRaV-3, respetiva casta e número de plantas existentes.....	23
Quadro 5 - Escalas qualitativas e quantitativas para os resultados do teste ELISA.....	26
Quadro 6 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Pintosa.....	27
Quadro 7 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Batoca.....	28
Quadro 8 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Esganoso.....	29
Quadro 9 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Lameiro.....	30
Quadro 10 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Espadeiro.....	31
Quadro 11 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Padeiro.....	31
Quadro 12 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Pintosa..	33
Quadro 13 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Batoca. .	33
Quadro 14 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Esganoso.....	34
Quadro 15 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Lameiro.	34
Quadro 16 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Espadeiro.....	35
Quadro 17 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Padeiro. .	35

Lista de abreviaturas

DAS-ELISA – Double antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ddNTP - Dideoxynucleótido

DNA – Ácido Desoxirribonucleíco

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GFkV – *Grapevine fleck virus*

GFLV – *Grapevine fanleaf virus*

GLRaV – *Grapevine leafroll-associated virus*

GRSPaV – *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*

GVA – *Grapevine virus A*

GVB – *Grapevine virus B*

GVD – *Grapevine virus D*

HTS – Sequenciamento de alto rendimento (High-Throughput Sequencing)

IC-PCR – Immuno-capture Polymerase Chain Reaction

NGS – Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing)

Nts - Nucleótidos

ORF – Open Reading Frames

PCR – Polymerase Chain Reaction

PEG – Polietilenoglicol

PLS-DA - Partial Least Squares Discriminant Analysis

POP – População experimental de clones

PORVID – Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira

PVP - Polivinilpirrolidona

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

Tween 20 – Polissorbato 20

Introdução

A vinha é uma cultura de elevado valor económico e cultural em Portugal. É uma cultura suscetível ao ataque de várias doenças parasitárias, dentro destas as viroses. Uma das viroses da videira com maior impacto económico sobre a mesma é a doença do enrolamento foliar da videira, dada a sua elevada expansão, em especial do GLRaV-3.

Portugal é um país rico em castas autóctones com características únicas. Com o avanço tecnológico e o conhecimento de castas mais produtivas e comerciais muitas destas castas autóctones correm o risco de se extinguir (White, 2009). Em Portugal, a seleção da videira, decorre há mais de 40 anos e é atualmente coordenada pela PORVID (Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira), mantendo-se uma coleção da variedade intravarietal das castas portuguesas no Pólo de Conservação da Diversidade da PORVID em Pegões e em ensaios de campo – distribuídos pelo país inteiro.

Com este estudo pretende-se analisar seis castas (10 clones por casta) que, numa prospeção conduzida pela PORVID na região dos Vinhos Verdes, revelaram uma elevada frequência do vírus do enrolamento foliar tipo 3. Estas plantas estão em vasos em Pegões (PORVID) desde 2013. Inicialmente manifestaram sintomas de GLRaV-3 e em testes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) previamente realizados na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) deram resultados positivos para esse vírus. Nos anos seguintes os mesmos clones não manifestaram sintomas, o que levou a questionar se as condições de temperaturas elevadas da região (em ANEXO estão as temperaturas registadas em 2013, 2014 e 2017) poderiam originar essa “termoterapia natural” quanto à doença em questão. O objetivo deste estudo é analisar o estado sanitário dessas videiras em relação a GLRaV-3 (*Grapevine leafroll-associated virus – 3*) para verificar em que medida as altas temperaturas de verão em Pegões terão influência na presença do vírus na planta e respetiva manifestação dos sintomas da doença.

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

1.1. Seleção clonal da videira em Portugal

Os primeiros trabalhos sistemáticos de seleção genética e sanitária das castas em Portugal começaram em 1978, sendo inicialmente conduzida pela “Rede Nacional de Seleção da Videira”, constituída por universidades e organismos de investigação, direções-regionais de agricultura, empresas e associações. Em 2009 nasce a PORVID, possibilitando que estes trabalhos passassem a contar com o envolvimento mais directo da indústria da vinha e do vinho. Esta é uma entidade de direito privado sem fins lucrativos, hoje com 23 associados públicos (onde se inclui a UTAD) e privados de todo o país. Entretanto o Estado cedeu à PORVID, mediante protocolo regulador, uma nova estrutura dedicada à conservação – o Pólo Experimental de Conservação da Diversidade da Videira em Pegões (PORVID, 2018).

Em 1984 os viticultores começaram por ter acesso aos primeiros resultados da selecção, através de materiais selecionados policlonais das principais castas, dentro destas já se obtivera materiais clonais de 24 desde 2005. Prevê-se que durante os próximos 4 anos fiquem disponíveis mais de 220 clones de mais de 35 das castas consideradas mais importantes. Para poder dar resposta às mudanças rápidas da vitivinicultura, a seleção terá de ser uma atividade permanente com estudo constante de outras castas e novos objetivos das já selecionadas. Estratégia essa levada a cabo pela conservação no Pólo de Conservação da Diversidade de Pegões e em parcelas de vinha através do país de mais de 30000 clones de 200 castas antigas (PORVID, 2018).

A erosão genética é um fenómeno que tem vindo a afetar a diversidade genética a nível mundial. No que diz respeito ao setor vitícola traduz-se na diminuição do número de castas cultivadas e dos genótipos de cada uma, consequência das modas, da regulamentação político-administrativa, do avanço da tecnologia vitícola e da própria seleção clonal. Assim, a PORVID foi criada com o principal objetivo travar a erosão genética e valorizar a variabilidade ainda existente. A sua metodologia pioneira aplicada às seleções é a única que evita a erosão genética, e assim torna-se possível que se alterem os objetivos da seleção indo ao encontro das necessidades de viveiristas e viticultores, que variam de acordo com os desafios ambientais, sanitários ou de mercado encarados ao longo do tempo (PORVID, 2015).

No que diz respeito a características quantitativas (como rendimento, açúcar, acidez, antocianas e muitas outras), as castas antigas de videira são populações heterogêneas. Sendo assim, para que se possa atingir uma eficácia máxima da seleção, é necessário começar o processo com toda a diversidade existente dentro da casta e avaliar as características pretendidas usando uma metodologia que se adeque à forte redução dos desvios ambientais e à expressão dos valores genéticos, maximizando tanto o diferencial de seleção como a heritabilidade (PORVID, 2018). A metodologia de seleção da videira conduzida pela PORVID (Martins e Gonçalves, 2015) está descrita na Figura 1.

A primeira etapa consiste numa prospeção de variabilidade intravarietal em vinhas velhas de diferentes regiões e para que a amostragem seja representativa dessa região deve conter um mínimo de 70 plantas, sem quaisquer relações mútuas entre si e marcadas em 20-30 vinhas independentes. No caso de castas cultivadas em várias regiões essa amostragem aproxima-se das 400 plantas. É plantado um ensaio de campo (vinha) com as videiras amostradas (PORVID, 2018).

De acordo com um delineamento experimental adequado à redução dos desvios ambientais (população experimental de clones, POP), neste ensaio é avaliado um número plural de plantas, à volta de 15 (Figura 1, 2ª fase), cada uma derivada por propagação vegetativa (clone). Assim passa-se a ter 15 desvios a incidir sobre o genótipo com uma média que tende para zero, vindo ao de cima o valor genotípico procurado (PORVID, 2015; PORVID, 2018).

Nos 3 a 6 anos seguintes fazem-se avaliações das várias características a seleccionar, finalizando com análises estatísticas para cálculo da heritabilidade, dos “melhores preditores lineares empíricos não enviesados” (empirical best linear unbiased predictor (EBLUP) dos efeitos genotípicos, e dos ganhos genéticos de selecção para diversos grupos de clones e características (PORVID, 2018).

É comum obter-se, com este método, seleções de grupos de clones cujos ganhos de rendimento variam de 10 a 40% e os ganhos do teor de açúcar do mosto (bem como outras características qualitativas) entre 5-10%. Trata-se do primeiro tipo de material seleccionado resultante desta metodologia – material policlonal, e o consequente uso direto de material de qualidade genética superior por parte dos viticultores (Figura 1). Além disso, com as análises feitas na POP, é possível conhecer melhor a amplitude da

diversidade da casta em todas as regiões em que é cultivada, o que otimiza o planejamento de seleções futuras, ajudando a compreender melhor a origem da casta (PORVID, 2018).

O segundo ciclo experimental consiste na instalação de 2 a 4 ensaios (campos de comparação clonal – CCClo), cada um com 20-40 clones selecionados na fase anterior, nas principais regiões de cultura da casta (Figura 1, fase 3). Esta fase tem como objetivo abranger na seleção outras características que seriam difíceis de avaliar na própria POP. Entre estas destaca-se a avaliação da interação do genótipo com o ambiente ($G \times E$), avaliação esta que só pode ser realizada quando são feitos vários ensaios (PORVID, 2018).

A interação $G \times E$ consiste na alteração do comportamento do genótipo (clone) em consequência de mudanças de ambiente, mas a alteração específica decorrente de cada combinação genótipo-ambiente, não é paralela à alteração sofrida por outros genótipos sob análise face à mesma mudança ambiental. Para compreender este fenómeno e minimizar os seus efeitos há que avaliar o padrão de variação das características dos clones em ambientes diferentes e rejeitar a seleção dos menos estáveis (PORVID, 2018).

Uma vez que os custos da experiência em campo com a videira são elevados o número de ambientes estudados é limitado o que dificulta o alcance dos resultados ideais no que respeita ao estudo da interação genótipo $\times$ ambiente. Assim, como estratégia complementar, são selecionados vários clones por casta (normalmente 7), oferecendo a possibilidade de cultivo de vários clones cada um com respostas diferentes às mudanças ambientais (PORVID, 2018).

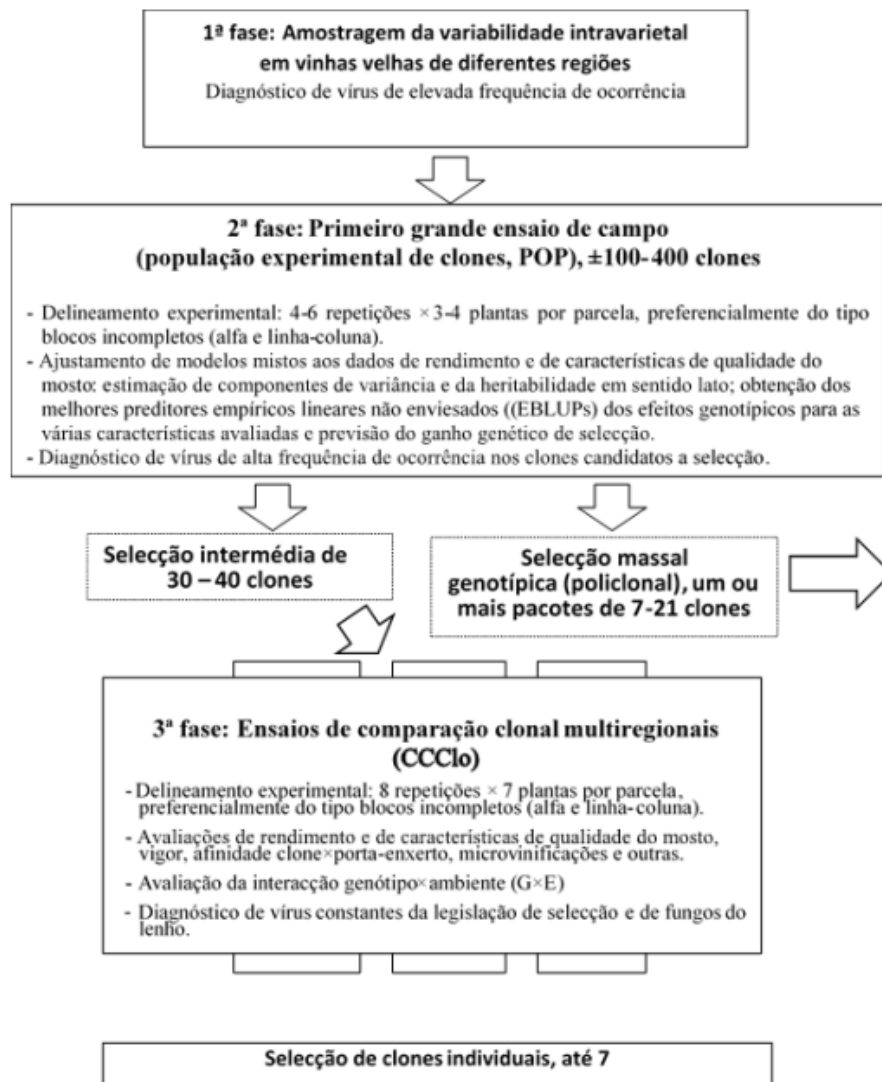


Figura 1- Esquema da metodologia de seleção clonal em Portugal. Fonte: PORVID, 2018

1.2. Caracterização das castas estudadas

1.2.1. Pintos

Castas tradicionalmente cultivadas nos Vinhos Verdes, branca, com baixa fertilidade nos olhos basais, no entanto a dimensão dos seus cachos pode ser de média a elevada, fazendo com que seja uma casta com produtividade média. Quando se recorre a poda longa há possibilidade de acréscimos de produtividade, o que tendo em conta o seu vigor é eventualmente recomendável. É uma casta com alguma suscetibilidade a doenças criptogâmicas. A maturação ocorre em época média. Os mostos têm médio teor alcoólico provável e elevada acidez, o que origina vinhos com relação álcool/acidez equilibrada, no entanto sem grande destaque aromático (Eiras-Dias et al., 2013).



Figura 2 - Cacho da casta Pintosã. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/pintosã/>

1.2.2. Batoca

Casta branca de qualidade média, autorizada em quase toda a Região Demarcada dos Vinhos Verdes exceto nas sub-regiões de Monção, Lima e Amarante. É uma casta rústica e muito produtiva, com cachos e bagos grandes, no entanto é suscetível a doenças criptogâmicas o que a torna irregular. Origina vinhos pouco aromáticos, macios, mas sem qualidade (Mota & Silva, 1986).



Figura 3 - Cacho da casta Batoca. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/batoca/>

1.2.3. Esganoso

Casta branca, muito importante na Região dos Vinhos Verdes. Tem baixa fertilidade nos olhos basais e produtividade média em poda curta, dependendo dos clones. O cacho tem tamanho médio e muito compacto com bagos pequenos, de peso médio a baixo. É sensível ao oídio e à podridão cinzenta dos cachos. A maturação é tardia e dá origem a mostos com baixo teor alcoólico provável e elevada acidez. Vinhos

com bom equilíbrio álcool/acidez, mas sem qualquer destaque aromático (Eiras-Dias et al., 2013; Magalhães, 2015).



Figura 4 - Cacho da casta Esganoso. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/esganoso/>

1.2.4. Lameiro

Casta tradicionalmente cultivada nos Vinhos Verdes. É uma casta branca cuja produtividade pode ser média a elevada, graças à sua média fertilidade bem como ao elevado peso dos cachos. A maturação das uvas desta casta é tardia. Dá origem a mostos com elevado potencial alcoólico, que mantêm acidez média. Estes vinhos são aromáticos e equilibrados (Eiras-Dias et al., 2013).



Figura 5 - Cacho da casta Lameiro. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/lameiro/>

1.2.5. Espadeiro

Casta tinta, característica da região dos Vinhos Verdes, muito produtiva e irregular. Produz cachos grandes com bagos médios. É bastante vigorosa o que fez com que tradicionalmente fosse conduzida em “uveira”, apesar de atualmente a condução em cordão ser a preferida. Tolerante ao vento e humidade, mas para amadurecer exige

elevadas somas de calor efetivo. É uma casta de maturação tardia. A sua vinificação habitual é feita em “bica aberta” para a produção de vinho rosé. Dá origem a vinhos de coloração rosada clara ou rubi aberto (quando submetidos a algum tempo de curtimento). As condições climatéricas da Região dos Vinhos Verdes são a causa do seu carácter tardio, desta feita as uvas têm teor em ácido málico elevado à vindima. Nos vinhos tradicionais esta característica é aproveitada para conferir “agulha” e acidez características dos vinhos verdes tintos apesar de a casta também ser apta para rosé estreme (Eiras-Dias et al., 2011; Magalhães, 2015).



Figura 6 - Cacho da casta Espadeiro. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/espadeiro/>

1.2.6. Padeiro

Casta tinta tradicionalmente cultivada nos Vinhos Verdes, sobretudo na sub-região de Basto. É uma casta de qualidade e produtiva, com cachos de tamanho e peso médios. Tem médio vigor e pouco rústica, quando sofre *stress* hídrico revela sintomas com facilidade, no entanto é pouco sensível à podridão do cacho. A maturação não é tardia nem precoce. Os mostos são ricos em açúcares e pouco ácidos e dão origem a vinhos de cor rubi a granada, com aroma a frutos vermelhos. Esta casta é usada principalmente para vinhos tintos de lote e rosados estremos (Eiras-Dias et al., 2011).



Figura 7 - Cacho da casta Padeiro. Fonte: <https://www.cipvv.pt/pt/castas/padeiro-padeiro-de-basto/>

1.3. Os vírus da videira

As videiras estão constantemente sujeitas a ataques por parte de agentes transmitidos por enxertia, e em 2018, Martelli, afirmou já serem conhecidas 84 espécies virais que podem afetar a videira, divididas em 32 géneros (Quadro1). Apenas alguns dos muitos vírus conhecidos estão confirmados como realmente prejudiciais para a videira, podendo afetar a sua produtividade, maturação e perenidade (Magalhães, 2015). O modo de propagação vegetativa, bem como as trocas entre materiais de propagação favorecem a dispersão e difusão desses agentes (Basso et al., 2017). Os vírus podem desempenhar um papel de elevada relevância na viticultura por alguns causarem grandes perdas de produtividade e diminuição do período produtivo das videiras, colocando por vezes em risco a sobrevivência da própria vinha no caso dos vírus de características degenerativas (Martelli, 2014).

Naidu et al. (2014) afirmam que a nível mundial já se identificaram mais vírus associados à videira que a qualquer outra cultura perene. Os vírus da videira documentados até à data dividem-se em quatro grupos principais com base na doença a que estão associados: vírus envolvidos na degenerescência infecciosa (*Grapevine fanleaf virus* – GFLV), vírus associados à doença do enrolamento foliar (*Grapevine leafroll-associated viruses* – GLRaV's), vírus associados ao complexo do lenho rugoso (*Grapevine rupestris stem pitting associated virus* – GRSPaV; *Grapevine virus B* – GVB e *Grapevine virus D* - GVD; *Grapevine virus A* - GVA) e vírus associados ao complexo do marmoreado (*Grapevine fleck virus* – GFkV e outros vírus latentes menos frequentes).

Quadro 1 Classificação taxonômica dos vírus da videira. Fonte: Martelli, 2018

Family	Genus	Species
Viruses with isometric particles (+)ssRNA genome		
<i>Secoviridae</i>	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus</i> (BBWV), <i>Grapevine fabavirus</i> (GFabV)*;
	<i>Nepovirus</i>	<i>Artichoke Italian latent virus</i> (AILV), <i>Arabidopsis mosaic virus</i> (ArMV), <i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BBLMV), <i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV), <i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> (GBLV), <i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV), <i>Grapevine deformation virus</i> (GDeV), <i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV), <i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV), <i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> (GTRV), <i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV), <i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV), <i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV), <i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV), <i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)
	Unassigned in the family	<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
	<i>Ilarvirus</i>	<i>Grapevine line pattern virus</i> (GLPV), <i>Grapevine angular mosaic virus</i> (GAMoV)
<i>Tombusviridae</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)
	<i>Tombusvirus</i>	<i>Grapevine Algerian latent virus</i> (GALV), <i>Petunia asteroid mosaic virus</i> (PAMV)
<i>Tymoviridae</i>	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine Syrah virus 1</i> (GSyV-1)*, <i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus</i> (GAMaV), <i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i> (GRVfV), <i>Blackberry virus S</i> (BVS), unnamed putative marafivirus-like virus,
	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV) <i>Grapevine redglobe virus</i> (GRGV)
<i>Luteoviridae</i>	<i>Enamovirus</i>	<i>Summer grape enamovirus</i> (SGEV), <i>Grapevine enamovirus-1</i> (GEV-1)*
Viruses unassigned to families	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV)
	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic virus</i> (SoMV)
Viruses with isometric particles dsRNA genome		
<i>Reoviridae</i>	<i>Oryzavirus</i> (?)	<i>Summer grape latent virus</i> (SGLV) = <i>Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus</i> (GCSV)
<i>Endornaviridae</i>	<i>Endornavirus</i>	<i>Grapevine endophyte endornavirus</i> (GEEV), three unnamed grapevine-associated endornaviruses
<i>Partitiviridae</i>	<i>Deltapartivirus</i>	<i>Grapevine cryptic virus 1</i> (GCV-1) = <i>Grapevine partitivirus 1</i> (GPV-1); an unnamed Grapevine-associated partitivirus
<i>Amalgaviridae</i>	<i>Amalgavirus</i>	An unnamed amalgavirus
Viruses with enveloped particles (-)ssRNA genome		
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)

Viruses with filamentous particles (+)ssRNA genome		
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2),</i>
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4), Grapevine leafroll-associated virus 13 (GLRaV-13)</i>
	<i>Velarivirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7),</i>
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X (PVX)</i>
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine stem pitting-associated virus (GSPaV); Grapevine virus T (GVT)*</i>
	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine berry inner necrosis virus (GINV), Grapevine Pinot gris virus (GPGV)*</i>
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A (GVA); Grapevine Virus B (GVB); Grapevine virus D (GVD); Grapevine virus E (GVE); Grapevine virus F (GVF); Grapevine virus G (GVG)*; Grapevine virus H (GVH)*; Grapevine virus I (GVI)*; Grapevine virus J (GVJ)*</i>
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Bean common mosaic virus (BCMV) peanut strain; An unidentified Potyvirus-like virus isolated in Japan from a Russian cultivar</i>
Viruses with rod-shaped particles (+)ssRNA genome		
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV), Grapevine virga-like virus (GVLV)*</i>
	Undetermined	
Viruses with a DNA genome		
<i>Geminiviridae</i>	<i>Grabovirus</i>	<i>Grapevine red blotch virus (GRBV)*; Wild Vitis virus 1 (WVV1)*; Grapevine geminivirus A (GGVA)*</i>
	Undetermined	<i>Temperate fruit decay-associated virus (TFDaV)*</i>
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Grapevine vein-clearing virus (GVCV)*; Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV)*; Grapevine badnavirus 1 (GBV-1)*</i>
Ill-defined, taxonomically unassigned viruses		<i>Unnamed filamentous virus, Grapevine Ajnashika virus (GAgV), Grapevine stunt virus (GSV), Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)</i>

Vírus marcados com asterisco foram descobertos por Sequenciamento de Próxima Geração.

Diversos fatores podem influenciar a expressão das doenças causadas por vírus. Podem ser ambientais, ou devido à casta, ou porta-enxerto, ou tipo de vírus ou estirpe, condições agronômicas ou a associação com outros vírus ou outros patógenos. A disseminação a longas distâncias dos vírus ocorre através de propagação vegetativa, ao passo que a transmissão local de planta para planta pode ocorrer pela ação de vetores como insetos, ácaros ou nematodes. O controlo para os vírus da videira incide fundamentalmente na determinação do seu estado sanitário, sendo essencial que o material vegetal usado na instalação de uma vinha seja certificado (Basso et al., 2017).

Para homologação de porta-enxertos é obrigatório fazer-se o despiste do *Grapevine fanleaf virus*, *Grapevine leafroll-associated virus 1 e 3*, *Grapevine fleck virus* e *Arabis mosaic virus (ARMV)*, sendo que para a homologação das castas também se exigem o despiste de todos os anteriores exceto o vírus do marmoreado (Magalhães, 2015).

1.4. Doença do enrolamento foliar da videira

1.4.1. Sintomatologia

As videiras afetadas pela doença do enrolamento foliar podem ser menos vigorosas que as videiras saudáveis (Cienniewicz & Fuchs, 2007). A manifestação dos sintomas depende das temperaturas da primavera e início de verão, ocorrendo principalmente a partir de Junho-Julho. Inicia-se desde a zona basal dos pâmpanos pelo enrolamento das folhas mais velhas para a sua página inferior que é acompanhado pelo aparecimento de manchas vermelhas nas castas tintas (Figura 8. A), ou amarelas nas castas brancas (Figura 8. B), manchas estas que coalescem de forma que precocemente a maior parte das folhas torna-se vermelha, ou amarela respetivamente, mantendo-se verdes as nervuras primárias e secundárias (Cienniewicz & Fuchs, 2015; Magalhães, 2015; Martelli, 2014). À medida que a estação avança os sintomas progridem ao longo do pâmpano, tornando-se o limbo espesso e quebradiço e por vezes apresenta manchas necróticas na página superior (Magalhães, 2015). Em situações extremas, toda a superfície das folhas ganha uma tonalidade roxa acentuada (Martelli, 2014).

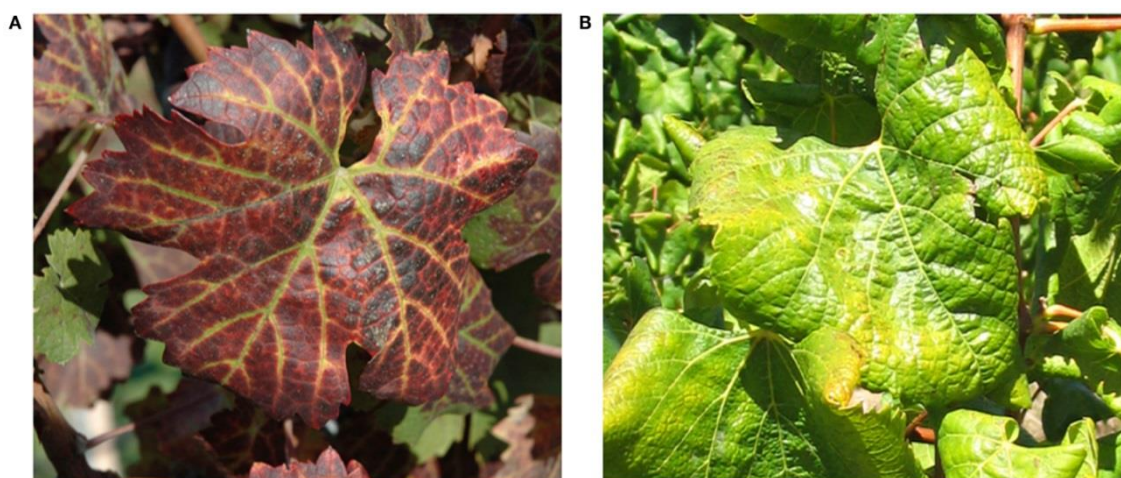


Figura 8. Sintomas típicos da doença do enrolamento foliar da videira. (A) Casta tinta de *Vitis vinifera*, Cabernet Franc; (B) Casta branca de *Vitis vinifera*, Chardonnay. Fonte: Maree et al., 2013.

Havendo uma grande redução dos pigmentos fotossintéticos ocorre, consequentemente, um atraso e desfasamento no amadurecimento dos frutos o que se traduz na diminuição da acumulação de sólidos solúveis nos bagos e aumento da acidez titulável. Por sua vez, o teor em antocianinas aumenta significativamente nas folhas das castas tintas, sendo responsável pelo seu característico vermelhão. (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Magalhães, 2015; Maliogka et al., 2015; Naidu et al., 2014; Moutinho-Pereira et al., 2012). Também já se verificou que o floema é afetado, ocorrendo obliteração e esmagamento dos elementos da seiva, o que prejudica a deslocação dos hidratos de carbono dos parênquimas foliares. Assim o amido acumula-se nos cloroplastos que se encontram degradados, causando o aumento da espessura e fragilidade das lâminas foliares (Martelli, 2014). As plantas infetadas podem ter uma significativa perda de produtividade, maioritariamente devido ao menor peso dos cachos (Moutinho-Pereira et al., 2012). Segundo Naidu et al. (2014) é comum que as videiras com doença do enrolamento foliar apresentem cachos de tamanhos reduzidos, frouxos e com bagos pequenos.

A expressão dos sintomas pode variar de acordo com a variedade, porta-enxertos, práticas culturais, clima, condições de solo e com número e tipo de vírus associados ao enrolamento foliar (Martelli, 2014; Naidu et al., 2014; Maree et al., 2013). Cultivares americanas, híbridos e porta-enxertos infetados geralmente permanecem sem sintomas, podendo sempre contribuir para a disseminação do vírus por vetores (Cienniewicz & Fuchs, 2015). Existem muitos casos de plantas em que a infeção está comprovada, mas os sintomas não se manifestam devido a temperaturas elevadas, não havendo alterações na maturação, por exemplo. Esta situação foi observada em clones da casta Castelão que em Palmela não manifestaram sintomas mesmo tendo já manifestado em Óbidos, bem como em clones de Touriga Nacional que não revelaram sintomas no Douro Superior tendo manifestado na região do Dão (Magalhães, 2015). Por sua vez Montero et al. (2017) observaram redução na assimilação de CO₂ e limitações na fotossíntese em plantas infetadas por GLRaV-3 assintomáticas. Algumas estirpes de GLRaV-2 e GLRaV-7 também dão origem a infeções sem sintomas (Naidu et al., 2014; REynard & Gugerli, 2018). Noutros casos as diversas variantes genéticas, dentro da mesma estirpe de vírus, manifestam sintomas diferentes nas videiras (Bester et al., 2018; Chooi et al., 2018). Ainda foi observado que num período vegetativo videiras infetadas há 24 meses

ou mais conseguem expressar os sintomas até 2 meses mais cedo que videiras cuja infecção ocorreu num período inferior a 12 meses (Chooi et al., 2018; Bell et al., 2015).

As respostas a infecções dos diferentes GLRaV's, ou combinações, podem variar significativamente de um porta-enxerto para outro. Algumas estirpes de GLRaV-2 já foram inclusivé reportadas por causarem incompatibilidade de enxertia letal para certas combinações de enxerto e porta-enxerto (Maree et al., 2013). Uma infecção mista de GLRaV-1 com GVA, por exemplo, é responsável por uma significativa diminuição do vigor das videiras, bem como um decréscimo da produção uma vez que tanto o número de cachos por videira como o seu tamanho são menores que nas videiras sãs, apesar de não afetar a maturação do fruto (Cuozzo et al., 2018; Mannini e Digiario, 2017).

1.4.2. Agentes causais e classificação

A doença do enrolamento foliar está associada a várias espécies de vírus (Quadro 2) designados por vírus do enrolamento foliar da videira (GLRaV), vírus estes que pertencem à família *Closteroviridae* (géneros *Closterovirus*, *Ampelovirus* e *Velavirus*), cujos genomas diferem em tamanho (variando entre 13,700 até 18,500 nucleótidos - nts) e estrutura (desde 6 a 12 genes). Estes podem atuar individualmente ou de forma combinada (Basso et al., 2017; Martelli et al., 2002). As diferentes espécies de vírus foram identificadas por não haver relação serológica entre elas, e por terem todas organizações genéticas distintas, sendo designadas por GLRaV-1, 2, 3, 4 (com 5 estirpes), 7 e 13. Na sua organização genética as várias estirpes têm fases de leitura aberta (open reading frames – ORF) distintas quer no tamanho quer em número (Quadro 2). Ainda não foi encontrada fonte de resistência a qualquer dos GLRaV's (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Martelli 2014; Naidu *et al.*, 2014; Martelli, 2018).

Quadro 2 - Classificação taxonómica de GLRaV e organização genética.

Vírus	Género	Tamanho do genoma (nts)	ORF's (nº)
GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	16,494	8
GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	18,659	9
GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	18,498	12
GLRaV-4	<i>Ampelovirus</i>	13,830	6
GLRaV-4 estirpe 5	<i>Ampelovirus</i>	13,384 ^a	6
GLRaV-4 estirpe 6	<i>Ampelovirus</i>	13,807	6
GLRaV-4 estirpe 9	<i>Ampelovirus</i>	12,588 ^a	6
GLRaV-4 estirpe Pr	<i>Ampelovirus</i>	13,696	6
GLRaV-4 estirpe Car	<i>Ampelovirus</i>	13,626	6
GLRaV-13	<i>Ampelovirus</i>	17,608	11
GLRaV-7	<i>Velavirus</i>	16,496	10

^a Sequência quase completa

Adaptado de: Ito & Nakaune, 2016; Martelli, 2012; Martelli, 2018; Naidu *et al.*, 2014.

1.4.3. Impacto e prejuízos

Naidu *et al.* (2014) referem uma perda de produção causada pela doença do enrolamento foliar até 40%. Cieniewicz & Fuchs (2007) também avaliaram esse parâmetro e estimam uma perda de rendimento, para situações em que não hajam quaisquer medidas de controlo, que varia entre 30-50% na casta Cabernet Franc na região de Nova Iorque, sendo o seu impacto económico muito significativo. Estes mesmos autores chegam a afirmar que em casos em que a prevalência da doença é muito elevada (mais de 25%) justifica-se financeiramente a substituição de toda a vinha. É a doença de origem viral que causa maior impacto económico a nível mundial (Basso *et al.*, 2017), sendo também a que tem maior dispersão na videira (Martelli, 2014).

Num estudo realizado na região de Nova Iorque, Atallah (2012) estimaram que a doença do enrolamento foliar, quando não aplicadas quaisquer medidas de controlo, tem um impacto económico nas vinhas com a casta Cabernet franc que varia de 25,407 \$/ha, isto quando a produtividade diminui 30% e a qualidade dos frutos mantém-se, até 41,000 \$/ha para os casos em que a produtividade da vinha fica reduzida em 50% e a qualidade dos frutos em 10%. Por sua vez, a aquisição de material vegetal certificado

tem um preço acrescido em 25%, no entanto há uma redução de perdas causadas pela doença do enrolamento foliar, ficando as perdas avaliadas em 1,829 \$/ha.

1.4.4. Disseminação

A disseminação dos vírus associados à doença do enrolamento foliar da videira ocorre maioritariamente através da propagação vegetal no que diz respeito a grandes distâncias. Pode ocorrer então através dos garfos, porta-enxertos ou enxertos prontos contaminados, quando se fazem enxertias ou plantação de uma nova vinha (Magalhães, 2015; Maliogka et al., 2015; Martelli, 2017; Naidu et al., 2014). A propagação do vírus na vinha, de planta para planta, é feita por várias cochonilhas e “*scale insects*”. No Quadro 3, estão os vetores conhecidos dos vírus do género *Ampelovirus*, sendo que foi estabelecida uma forte relação entre o aparecimento da infeção e a existência de vetores na estação anterior. Para o GLRaV-2 e 7 ainda não existem vetores conhecidos (Basso et al., 2017; Cooper et al., 2018; Martelli, 2014). Apesar de várias espécies do género *Closterovirus* serem transmitidos por várias espécies de afídeos, não existem provas de que GLRaV-2 seja transmitido por qualquer afídeo (Naidu et al., 2014). O facto de não se conhecerem vetores para GLRaV-2 fortalece a teoria de que este vírus é transmitido apenas pelo material de propagação infetado e não se propaga na vinha, no entanto existem relatos de infeções em videiras que crescem em ambientes naturais. Assim, a epidemiologia de GLRaV-2 continua por esclarecer (Martelli, 2018).

As cochonilhas, na sua grande maioria, hibernam na forma de ovos ou em ninfas de primeiro instar debaixo do ritidoma. Poucas espécies conseguem hibernar no solo, nas raízes. As fêmeas não têm asas pelo que a sua mobilidade é reduzida, enquanto os machos, apesar de terem asas, possuem armadura bucal vestigial e por essa razão são incapazes de se alimentar e transmitir vírus. Dada a limitação na sua mobilidade, a capacidade de disseminação de GLRaV pelas cochonilhas fêmeas ocorre de forma lenta, a menos que haja influência da atividade humana ou que estas sejam arrastadas pelo vento o que é possível devido ao seu tamanho reduzido (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Naidu et al., 2014). A fase de ninfa de primeiro instar é a mais eficiente para a transmissão de GLRaV uma vez que nessa fase estes insetos são mais aptos à dispersão, sendo rastejadores (Naidu et al., 2014; Tsai et al., 2008).

Não existem evidências de especificidade de transmissão vírus-vetor entre as diferentes espécies de cochonilhas e *Ampelovirus* (Tsai et al., 2010), mas estudos de

Tsai et al. (2008) sugerem que a transmissão pelas cochonilhas (*Planococcus ficus*, neste caso) é semi-persistente (Tsai et al., 2008) e circulativa uma vez que Cid et al. (2007) detetaram a presença de GLRaV-3 nas glândulas salivares primárias da cochonilha *Planococcus citri*. Suportando esta mesma hipótese, McGreal et al. (2018) estudaram a retenção e transmissão de GLRaV-3 nas cochonilhas *Pseudococcus calceolariae* observando um período máximo de retenção do vírus de 11 dias, sugerindo tratar-se de transmissão circulatória e, para além disso, sugerem que as plantas de cobertura podem atuar como dissipadores do vírus, mas isto apenas acontecerá se as cochonilhas se instalarem e alimentarem dessas plantas por um período superior a 11 dias.

Quadro 3- Vetores conhecidos da doença do enrolamento foliar da videira.

Vírus	Cochonilhas	“Scale insects”
GLRaV-1	<i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> , <i>Ps. affinis</i> , <i>Ps. calceolariae</i> , <i>Ps. viburni</i> , <i>Ps. maritimus</i> , <i>Ps. Comstocki</i> , <i>Ph. aceris</i> .	<i>Pulvinaria vitis</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> .
GLRaV-3	<i>Planococcus ficus</i> , <i>Pl. citri</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Ps.</i> <i>calceolariae</i> , <i>Ps. maritimus</i> , <i>Ps. affinis</i> , <i>Ps. viburni</i> , <i>Ps.</i> <i>comstocki</i> , <i>Phenacoccus</i> <i>aceris</i> .	<i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Pulvinaria vitis</i> , <i>Coccus</i> <i>hesperidium</i> , <i>C. longulus</i> , <i>Saissetia sp.</i> , <i>Parasaissetia sp.</i> <i>Ceroplastes rusci</i> .
GLRaV-4 e estirpes	<i>Ps. longispinus</i> , <i>Pl. ficus</i> , <i>Ph. aceris</i> .	<i>Ceroplastes rusci</i>

Fonte: Martelli, 2017, Naidu, 2014 e Mahfoudhi et al., 2009.

A dispersão dos vírus é influenciada pelas espécies de vetores existentes na região de cultivo, pela sua eficiência de fecundação e de transmissão, bem como hábitos alimentares, capacidade de movimento de uma videira para a outra e preferência entre castas. Também pertencem ao grupo de condicionantes para a dispersão da doença as variações ambientais e paisagísticas e as práticas culturais da vinha (Naidu et al., 2014).

1.4.5. Estratégias de proteção

Por não haver cura para a doença do enrolamento foliar da videira a estratégia de proteção mais importante é a prevenção. Para impedir que ocorram infecções pelos vírus do enrolamento foliar em primeiro lugar deve-se usar material vegetal certificado (porta-enxertos, enxertos prontos e garfos) de viveiros oficialmente certificados (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Magalhães, 2015), também devem ser adotadas estratégias de prevenção a nível cultural, sanitário e de controlo de vetores (Naidu et al., 2014).

A inspeção das vinhas por sintomas e marcação (se justificado, eliminação) das plantas doentes são um conjunto de medidas que podem reduzir o impacto económico da doença, bem como o controlo dos vetores dos *Ampelovirus* (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Martelli, 2014; Naidu et al, 2014). No caso de GLRaV-2 e -7 a remoção das plantas infetadas significa a eliminação da doença, já no caso dos *Ampelovirus* traduz uma grande redução de fonte de reinfeção da vinha (Cieniewicz & Fuchs, 2007; Naidu et al., 2014).

Após replantação de videiras ou de uma vinha é muito difícil protegê-las de uma nova infeção. Assim sendo as medidas a adotar para prevenir a reinfeção consistem em maximizar a distância entre vinhas novas e vinhas infetadas e remover videiras infetadas mal mostrem sintomas. Para que estas medidas atinjam a máxima eficácia é importante haver inspeções frequentes entre o pintor e a colheita. Também é importante ter o cuidado de limpar todos os equipamentos usados em diferentes vinhas uma vez que estes podem ajudar a dispersar dos vectores (Martelli, 2014; Naidu et al., 2014).

Deve-se prestar atenção à presença de *Planococcus ficus* e *Pseudococcus vibruni*, estes vetores podem ser encontrados nas raízes das videiras que ficam no solo após a remoção de plantas infetadas. Caso estejam presentes no campo após remoção da vinha infetada é aconselhável haver um ano de pousio de modo a que se quebre o ciclo da doença (Naidu et al., 2014).

Estas são medidas importantes no que diz respeito ao estado sanitário da vinha, mas também para a redução da disseminação dos vírus para vinhas sãs (Naidu et al., 2014).

1.5. Métodos de diagnóstico para os vírus da videira

Métodos de diagnóstico fidedignos assumem elevada relevância no que diz respeito à manutenção do estado sanitário das vinhas, quer seja em programas de certificação ou no diagnóstico de videiras no campo. O diagnóstico de vírus tem evoluído ao longo dos anos, desde a monitorização do estado sanitário da vinha, indexagem biológica, microscopia eletrónica de transmissão (TEM), métodos serológicos com base em testes ELISA, hibridação de ácidos nucleicos com sonda, métodos moleculares com base em PCR (Polymerase Chain Reaction) e recentemente técnicas de sequenciamento de alto rendimento (High-throughput sequencing – HTS) (Basso et al., 2017).

Segundo Bell et al. (2017), a observação visual dos sintomas no campo é um método de diagnóstico em castas tintas para se proceder à eliminação das videiras doentes. Quando os sintomas são observados se necessário recorre-se aos métodos de diagnóstico laboratoriais para confirmação da infeção (Magalhães, 2015).

A indexagem biológica consiste na observação de sintomas em plantas indicadoras (do género *Vitis*), através da enxertia. Após enxertia, com material da planta a diagnosticar, as plantas indicadoras são plantadas no campo, sendo necessário esperar até dois anos para que os sintomas se desenvolvam. É um método demorado e pouco eficiente quando os sintomas são pouco evidentes e as infeções latentes. Os indicadores utilizados podem ser escolhidos de acordo com preferências pessoais ou as condições climáticas a que a planta vai estar sujeita, sendo por norma os seguintes: o híbrido Baco 22A, na Califórnia; Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Melot e Barbera, na Europa meridional; Pinot Noir, na Europa setentrional (Magalhães, 2015; Maree et al., 2013). A indexagem biológica é um método utilizado sobretudo em programas de certificação ou quando surgem novas doenças para as quais ainda não é possível o diagnóstico serológico ou molecular (Basso et al., 2017; Maliogka et al., 2015).

Os métodos de diagnóstico serológicos detetam a presença do vírus no material vegetal utilizando como reagente anticorpos específicos do vírus, as técnicas mais específicas, simples, sensíveis e económicas baseiam-se na serologia de anticorpos específicos. Destas técnicas a mais utilizada é o teste ELISA, este utiliza anticorpos específicos do vírus a testar marcados enzimaticamente de forma a detetar-se a sua presença (Cortez, 2002). O teste ELISA distingue-se das restantes técnicas serológicas

porque estas são baseadas na formação de precipitados imunes, ao passo que o ELISA baseia-se na detecção sensível de reações não precipitantes, sendo isto possível apenas pelo uso de anticorpos marcados por enzimas. Graças ao uso das enzimas para marcação dos anticorpos o método ELISA não é dependente da proporção de anticorpo para antigénico como é o caso dos restantes métodos serológicos (Clark & Adams, 1977). Neste método é possível realizar um processo direto ou indireto, sendo que o processo direto mais utilizado é o “Double Antibody Sandwich”-ELISA (DAS-ELISA) em que o anticorpo marcado liga-se diretamente ao antigénio (Cortez, 2002). É de salientar a importância do cuidado e preparação das amostras, sendo que apenas podemos ter resultados de confiança se as amostras consistirem nos tecidos apropriados e na altura do ano correta. Para uma boa detecção dos GLRaV's devem-se testar amostras de pecíolo colhidas no final do verão ou início do outono ou aparas obtidas de tecido lenhoso no inverno (Naidu et al., 2014). Já Shabanian et al. (2018) afirmam que nos métodos serológicos a melhor altura do ano para se testar a concentração de vírus na videira é a meio do verão, sendo que estes autores desenvolveram o trabalho na região de Ontário no Canadá onde os verões são frescos.

O teste ELISA, é um método que possibilita o tratamento de várias amostras ao mesmo tempo, sensível, muito simples, robusto e económico, com grande potencial quantitativo, o que lhe confere popularidade, no entanto o teste ELISA não é tão sensível quanto os métodos baseados na detecção do ácido nucleico (Clark & Adams, 1977; Maree et al., 2013; Ward et al., 2004).

Os métodos baseados em ácido nucleico têm vindo a ser cada vez mais usados na detecção de vírus das plantas. O Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) foi desenvolvido para detecção de patogénicos com genoma RNA, tal é o caso da maioria dos vírus da videira (Ward et al., 2004). Os métodos mais utilizados para testes de rotina são o RT-PCR convencional e o RT-PCR a tempo real e suas variações. Uma dessas variações é o Immuno-capture PCR (IC-PCR), a qual deteta o agente viral através do uso de anticorpos de forma a imobilizar o vírus para depois prosseguir-se com a amplificação por RT-PCR. Outra é TaqMan RT-PCR de tempo real com a finalidade da detecção simultânea dos GLRaV-1, -2, -3 e -4, que se mostrou ser mais sensível que o RT-PCR convencional (Maree et al., 2013).

De forma a diminuir os custos dos testes e aumentar a sua eficiência, Sánchez-Navarro et al. (2018) fizeram um estudo comparativo da detecção de vírus e viróides da videira por RT-PCR com o uso de uma sonda individual e com o uso de três polissondas (uma capaz de detetar 13 vírus, outra capaz de detetar 5 viróides e a última capaz de detetar os 18 patogénios das duas sondas anteriores). Os autores observaram que todas as amostras positivas detetadas pela sonda individual também foram detetadas pela polissonda correspondente, mostrando a viabilidade do método.

Os métodos de diagnóstico de rotina mais utilizados são o ELISA e o RT-PCR (Naidu et al., 2014). Estes são métodos rápidos e eficientes, no entanto apenas podem ser realizados para vírus cujos anticorpos ou sequências de nucleótidos específicos já estejam identificados. Quer no ELISA como no RT-PCR não é possível detetar outras viroses (conhecidas ou não) que possam ter contaminado a planta, nem distinguir diferentes variantes genéticas do mesmo vírus (Basso et al., 2017; Maree et al., 2013).

O sequenciamento de Sanger foi o pioneiro no sequenciamento genético (Pisapia et al., 2018). Neste método é possível determinar uma sequência de nucleótidos numa cadeia de DNA graças ao uso de um nucleótido quimicamente modificado (dideoxinucleótido – ddNTP) que termina a síntese de DNA pela DNA polimerase. Os ddNTP's não possuem grupo hidroxilo, pelo que não se ligam ao nucleótido seguinte, interrompendo o crescimento da cadeia. No fim deste processo obtém-se uma mistura de fragmentos de DNA de comprimentos diferentes. Os fragmentos de DNA recém-sintetizados são sequencialmente separados por tamanho através de eletroforese capilar em gel. Cada ddNTP (A, T, C ou G) está marcado com um corante fluorescente diferente, essa fluorescência é detetada por um detetor automático de sequência e a ordem dos nucleótidos do DNA alvo é visualizado por cromatograma (Pisapia *et al.*, 2018).

O sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing - NGS), também conhecido como sequenciamento de alto rendimento (High-Throughput Sequencing - HTS), consegue contornar as limitações do teste ELISA, do PCR e do sequenciamento de Sanger (Maree et al., 2013). Tem sido uma ferramenta revolucionária na investigação dos vírus da videira (Basso et al., 2017). Utilizando adaptadores universais em vez de primers de sequenciamento específicos é possível identificar o “viroma” completo das videiras, providenciando o complexo de vírus e

viróides acumulados nas plantas ao longo do tempo mesmo sem haver conhecimento prévio dos organismos presentes, isto sem que as amostras tenham de ser sujeitas aos procedimentos laboratoriais convencionais mais demorados. Com o NGS tem sido mais fácil descobrir patógenos virais que até agora eram desconhecidos de uma forma muito mais rápida, para além de permitir fazer a classificação taxonómica destes agentes. Com o decorrer do tempo tornou-se evidente que esta ferramenta tem grande utilidade para a certificação do estado sanitário do material de propagação da videira uma vez que o NGS pode fornecer informações sobre complexos de doenças, variantes dominantes de espécies virais e a frequência de vírus encontrados em material infetado (Maree et al., 2013; Martelli, 2018). Apesar de ser muito útil para a deteção de agentes patogénicos, a deteção de uma sequência patogénica numa planta não implica que este será o agente causal de determinada doença ou de tal sintoma, apenas que essa sequência genética se encontra na planta. Isto significa que estabelecer a significância biológica dos vírus identificados pela técnica de NGS é essencial, o que é feito pela avaliação da transmissão por enxertia, postulados de Koch, estudos de distribuição de vírus e disseminação de vetores, e também pela determinação da relevância agronómica dos sintomas (Rwahni, 2018).

Também existem pesquisas para que se consiga fazer diagnóstico de vírus de forma não destrutiva. É o caso de trabalhos realizados por Pagay et al. (2018) que detetaram infeções causadas por vírus em videiras através do uso de espectrómetros de imagem infravermelha, com sensores hiperespectrais, cujos resultados foram analisados com a metodologia de classificação baseada na análise discriminante por mínimos quadrados parciais (partial least squares discriminant analysis - PLS-DA). Apesar de ainda serem necessários estudos complementares que aumentem a precisão deste método, esta ferramenta pode ser muito útil na deteção de vírus em castas brancas uma vez que estas geralmente são assintomáticas, bem como para a eliminação das plantas infetadas antes da manifestação dos sintomas e em viveiros de produção de material certificado.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1 – Material vegetal e condições de crescimento

O material vegetal utilizado para o trabalho foi recolhido nos dias 11 e 12 de setembro de 2017 de plantas envasadas, no Pólo de Conservação da Diversidade da Videira da PORVID, situado em Pegões. Foram testadas 6 castas dos Vinhos Verdes, sendo 4 brancas (Pintosa, Batoca, Esganoso e Lameiro) e 2 tintas (Espadeiro e Padeiro). De cada casta testaram-se entre 1 a 4 plantas por clone, como se pode ver no quadro 4, assim foram testados 59 clones num total de 175 plantas. O intuito inicial era de analisar 4 plantas por clone (num total de 236 plantas) no entanto algumas videiras já não existiam no Pólo.

Quadro 4 – Clones testados por ELISA para GLRaV-3, respetiva casta e número de plantas existentes.

Casta	Clones com 1 planta	Clones com 2 plantas	Clones com 3 plantas	Clones com 4 plantas
Pintosa	1003-07; 2038-09;	2038-14;	2038-09; 1002-03; 2038-17;	1002-57; 2047-33; 2047-36; 2047-52; 2038-13
Batoca	2047-11;	1003-84; 1003-54;	2046-10;	2036-16; 2036-17; 1003-88; 2036-18; 2041-02; 1002-04;
Esganoso	2042-11;		1005-17; 2020-15;	2020-13; 2042-97; 2020-02; 2042-04; 1009-64;
Lameiro	1009-109; 1003-17;	1002-33; 1003-12;	1001-34; 1001-33; 1001-41;	1005-16; 1006-15; 1009-130;
Espadeiro	2029-119; 2025-12; 2029-07;	2029-05;	2029-80;	2014-52; 2014-06; 2029-88; 2034-04; 2022-51;
Padeiro		1009-68; 1009-76; 2009-02; 2014-08; 2014-20;	1009-60;	2014-25; 2014-31; 2014-07; 2014-51;

Todas estas plantas manifestaram inicialmente sintomas de GLRaV-3 e em testes ELISA previamente realizados na UTAD em 2013 deram resultados positivos para esse vírus, no entanto nos últimos anos estes mesmos clones não têm manifestado sintomas (A. Martins e E. Gonçalves, inf.pessoal).

2.2 – Acompanhamento de sintomas

O acompanhamento dos sintomas foi feito a 14 de junho e 6 de julho de 2017, bem como aquando da recolha das amostras, em setembro de 2017. A sintomatologia considerada foi o enrolamento das folhas para a página inferior, a coloração precoce avermelhada para as castas tintas e clorose precoce para as castas brancas, mantendo-se as nervuras principais a verde.

Após o estudo dos resultados obtidos nos testes ELISA em 2017 voltou-se a fazer uma visita ao campo experimental da PORVID, onde se encontram os clones estudados. A visita teve o intuito de observar visualmente a possível existência de sintomas em alguns casos de maior contraste de resultados 2013 vs. 2017. Nesta visita, em Julho de 2018, foram tiradas fotografias a estes casos, conforme ficheiro fotográfico em CD.

2.3 – Teste DAS-ELISA

Em cada planta, envasada desde 2013, recolheram-se 2 amostras do mesmo sarmento, uma consistindo em 3 folhas com pecíolo da zona basal do sarmento (amostra A) e outra de vara não atempada com folhas na extremidade apical (amostra B), conforme ilustrado na Fig.9. Algumas plantas dos clones a estudar estavam secas e não tinham folhas, por isso nesses casos recolheu-se material atempado tanto da extremidade como da zona basal da vara. Para além disso também existiam plantas cujo único sarmento com folhas viáveis para recolha de amostras apresentava sinais de corte na extremidade, assim não foi possível a recolha de tecido não atempado com folhas na extremidade apical, pelo que esta segunda amostra foi substituída pelas 3 folhas mais jovens.

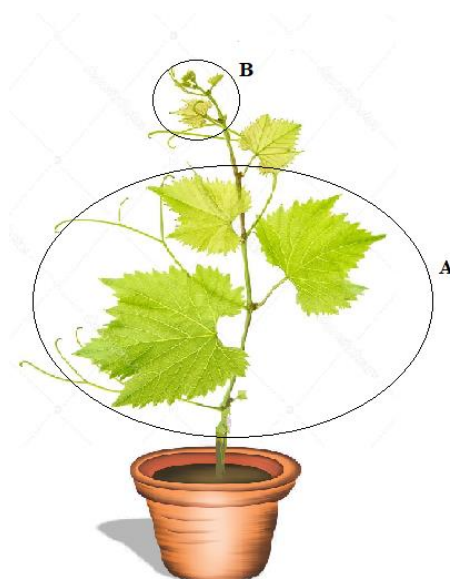


Figura 9. Amostras recolhidas, sendo A o conjunto de folhas com pecíolo da zona basal do sarmento, e B a vara não atempada com folhas na extremidade apical.

Os testes ELISA (com antissoros AGRITEST, SRL, Bari, Itália) foram feitos no Laboratório de Fitopatologia da UTAD, de 18 a 29 de setembro de 2017. As 347 amostras foram testadas em duplicado (Nunc imunoplate Maxisorp) com aplicação de 100µL/alvéolo. O material vegetal foi macerado com o homogeneizador T25 IKA Labortechnik da marca Janke & Kunkel e diluído em tampão de extração Tris-HCL, pH 8,2 com 2% PVP, 1% PEG e 0,05% de Tween 20. O substrato cromogénico da fosfatase alcalina utilizado foi o p-nitrofenil fosfato. Adotaram-se as concentrações e períodos de incubação aconselhados pelo fabricante e metodologia também previamente utilizada no Laboratório de Fitopatologia (Bettencourt *et al.*, 2009).

No final de cada teste fizeram-se leituras de absorvância a 405nm no espetofotómetro Multiskan Ex. Foram consideradas positivas as amostras com absorvância superior a 3 vezes o controlo negativo desde que superior a 0,100.

2.4 – Metodologia para análise dos resultados

Para melhor se poder estabelecer relações entre os sintomas observados e os resultados do teste ELISA de 2017 realizou-se um levantamento numa folha de cálculo (em anexo no CD) dos sintomas observados à recolha das amostras em Setembro de 2017, dos sintomas observados em Julho de 2018, bem como os valores de leitura da

absorvância do teste ELISA de 2017. Cada resultado do teste ELISA foi classificado de acordo com as escalas definidas no Quadro 5.

Foi feita uma análise comparativa qualitativa entre os resultados do teste ELISA de 2013 e os de 2017, de modo a avaliar as diferenças no estado sanitário das plantas. Também se estabeleceu uma relação entre os resultados obtidos em 2017 e a sintomatologia observada.

De modo a estudar se a concentração de vírus difere com a posição da amostra na planta (apical e basal) fez-se uma análise de variância a um fator de efeitos fixos (posição da amostra na planta, com dois níveis, apical e basal). O ajustamento deste modelo foi realizado no *software* R (The R Foundation, 2019).

Quadro 5 - Escalas qualitativas e quantitativas para os resultados do teste ELISA.

	Qualitativa	Quantitativa
Negativo	-	< 0,100
Positivo fraco	(+)	0,100 – 0,199
Positivo	+	0,200 – 0,999
	++	1,000 – 1,499
Positivo forte	+++	≥1,500

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 – Estado sanitário dos clones em 2013 e em 2017

No Quadro 6, onde são apresentados os resultados da casta Pintosa, pode-se observar que em 2013 os clones 1003-07, 2047-33, 2047-36, 2047-52, 2038-09, 2038-10, 2038-13, 2038-14 revelaram-se positivos para o GLRaV-3 e no teste ELISA de 2017 mantiveram os resultados positivos. Tanto o clone 2038-17 como o clone 1002-57 deram resultados positivos em 2013, à semelhança do que ocorreu em 2017 à exceção de uma amostra cujo resultado foi negativo (2A e 4B respetivamente). Nos testes realizados em 2013 o clone 1002-03 revelou-se positivo para o GLRaV-3, no entanto nos resultados obtidos em 2017 verificou-se estar negativo para o vírus.

Quadro 6 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Pintosa.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
1002-57	(+)	+	++	++	+	+	++	++	-
1003-07	(+)	++	+	a)	a)	a)	a)	a)	a)
2047-33	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
2047-36	+	++	+++	++	+++	+	b)	+	+++
2047-52	+	++	++	++	+	+	+	+	++
2038-09	++	+++	+++	+++	+++	+	+	a)	a)
2038-10	++	++	++	a)	a)	a)	a)	a)	a)
2038-13	++	+	+	+	+	+	+	+	++
2038-14	++	++	(+)	+	++	a)	a)	a)	a)
1002-03	+++	-	-	-	-	-	-	a)	a)
2038-17	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	a)	a)

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Para a casta Batoca (Quadro 7) constata-se que em 2013 o clone 2036-17 verificou-se negativo para o GLRaV-3 o que não aconteceu em 2017, sendo que todas as amostras tiveram resultados positivos à exceção de uma que se manteve negativa (3B). Este caso sugere uma infeção com GLRaV-3 posterior aos testes realizados em

2013 nas plantas do clone 2036-17. Por sua vez o clone 1003-88 deu positivo em 2013, o que não se verificou em 2017 uma vez que apenas duas amostras (da mesma planta) continuaram positivas e as restantes mostraram-se negativas para a presença do vírus. O clone 2036-18 também era positivo em 2013, sendo que a maioria das amostras testadas em 2017 permaneceram positivas à exceção de uma que obteve resultado negativo (3B). Os restantes clones (1003-84, 2041-02, 2047-11, 1003-54, 1002-04 e 2046-10) mantiveram em 2017 os resultados positivos obtidos em 2013 para o GLRaV-3, à semelhança do clone 2036-16 que se manteve negativo de 2013 até 2017.

Quadro 7 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Batoca.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
2036-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2036-17	-	+	+	(+)	-	+	+	+	+
1003-84	(+)	+++	++	++	+	a)	a)	a)	a)
1003-88	(+)	-	-	-	-	+	+	-	-
2036-18	+	+	(+)	+	+	(+)	-	+	(+)
2041-02	+	++	+++	+	++	++	+++	++	+++
2047-11	+	+++	++	a)	a)	a)	a)	a)	a)
1003-54	+	+	+	+	+	a)	a)	a)	a)
1002-04	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
2046-10	++	+++	+	+++	+	+++	+	a)	a)

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Ao observar o Quadro 8, que apresenta os resultados da casta Esganoso, pode-se constatar que em 2013 o clone 2020-13 deu negativo para o GLRaV-3, no entanto os testes realizados em 2017 deram resultados positivos. Em contraste os clones 2020-15 e 2042-04 revelaram-se positivos em 2013 sendo que em 2017 ambos tiveram duas amostras (3A e 3B, e 2A e 2B respetivamente) com resultados negativos para o GLRaV-3 e as restantes amostras positivas. O clone 2042-97, que em 2013 deu resultados negativos, manteve os mesmos resultados em 2017, ao passo que os restantes clones (1005-17, 2020-02, 2042-11 e 1009-64) mantiveram-se positivos no mesmo intervalo de tempo para a presença do GLRaV-3.

Quadro 8 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Esganoso.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
2020-13	(-)	(+)	^{b)}	+	+	+	+	+	+
2042-97	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-
1005-17	(+)	+	++	+	+	++	++	a)	a)
2020-02	+	++	+++	+++	++	+++	++	+	+++
2020-15	+	(+)	+	+	+	-	-	a)	a)
2042-04	+	+	+	-	-	+	(+)	a)	a)
2042-11	+	(+)	(+)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
1009-64	+	+++	++	++	(+)	+++	+++	+++	+++

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Na casta Lameiro (Quadro 9) em 2013 o clone 1005-16 teve resultados positivos para o GLRaV-3 e em 2017 houve uma amostra cujo resultado deu negativo (2A), mantendo-se as restantes amostras positivas. Os restantes clones testados (1001-34, 1009-109, 1006-15, 1009-130, 1002-33, 1003-17, 1001-33, 1001-41 e 1003-12) encontravam-se positivos em 2013 e assim permaneceram em 2017. Assim, nesta casta foi onde se observaram menos alterações no estado sanitário das plantas para este vírus..

Na casta Espadeiro (Quadro 10), o clone 2029-88 teve resultados positivos em 2013 para o GLRaV-3, no entanto em 2017 houve uma amostra (1A) cujo resultado foi negativo ao passo que as restantes permaneceram positivas. Com o clone 2034-04 aconteceu semelhante, em 2013 os resultados foram positivos e em 2017 houve duas amostras (3A e 3B) da mesma planta que tiveram resultados negativos enquanto as remanescentes continuaram positivas. Para o clone 2022-51 os resultados obtidos em 2013 mostraram-se positivos quanto à presença de GLRaV-3 enquanto em 2017 quatro das amostras testadas (1B, 2B, 3B, 4B) deram negativo e as outras quatro continuaram positivas. O clone 2029-80 obteve resultados negativos em 2013 e estes mantiveram-se em 2017. Já o clone 2029-119 obteve resultados negativos em 2013 e em 2017 teve uma amostra positiva e outra que permaneceu negativa para o GLRaV-3. Os restantes clones (2014-52, 2025-12, 2014-06, 2029-05 e 2029-07) encontravam-se positivos em 2013 e continuavam positivos em 2017.

Quadro 9 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Lameiro.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
1001-34	(+)	++	+	+	+++	+++	+++	a)	a)
1009-109	(+)	+	+	a)	a)	a)	a)	a)	a)
1005-16	+	+	+	-	+	+	++	+	+
1006-15	+	++	++	++	+++	++	+++	+++	++
1009-130	+	+	++	+	+	+	+	+	+
1002-33	+	++	++	++	+	a)	a)	a)	a)
1003-17	+	+++	+++	a)	a)	a)	a)	a)	a)
1001-33	++	+	+++	+	+	+	+	a)	a)
1001-41	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	a)	a)
1003-12	+++	+++	+	++	+++	a)	a)	a)	a)

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Observando o Quadro 11, onde estão os resultados da casta Padeiro, verifica-se que o clone 2009-02 teve resultados positivos em 2013 e em 2017 teve duas amostras (1A e 1B) negativas da mesma planta e duas positivas para o GLRaV-3. O clone 2014-08 também teve resultados positivos em 2013 e em 2017 uma amostra (1B) deu resultado negativo sendo que as restantes permaneceram positivas. Os clones restantes (1009-68, 2014-25, 2014-31, 1009-60, 1009-76, 2014-07, 2014-20 e 2014-51) tiveram resultados positivos em 2013 e permaneceram positivos em 2017.

Quadro 10 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Espadeiro.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
2029-119	(-)	(+)	-	a)	a)	a)	a)	a)	a)
2029-80	(-)	-	-	-	-	-	-	a)	a)
2014-52	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	+
2025-12	(+)	+	+	a)	a)	a)	a)	a)	a)
2014-06	+	+	++	++	+	++	+	+	++
2029-88	+	-	(+)	+++	+++	+	+	++	+++
2034-04	+	++	+++	+	+++	-	-	+	++
2029-05	++	++	+	+	++	a)	a)	a)	a)
2029-07	++	+	(+)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
2022-51	+++	+	-	(+)	-	+	-	(+)	-

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Quadro 11 - Comparação de resultados do teste ELISA em 2013 e em 2017 para os clones da casta Padeiro.

Clone	ELISA 2013	ELISA 2017							
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
1009-68	(+)	+++	+	+	++	a)	a)	a)	a)
2014-25	(+)	+	+	+	+	++	+	+	+
2014-31	(+)	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++
1009-60	+	++	++	+	+	++	++	a)	a)
1009-76	+	+	++	+	+++	a)	a)	a)	a)
2009-02	+	-	-	+	+	a)	a)	a)	a)
2014-07	+	+	+	+	+	++	+	+	+
2014-08	+	+	-	+	(+)	a)	a)	a)	a)
2014-20	+	+	+	(+)	b)	a)	a)	a)	a)
2014-51	+	+	++	+	+	(+)	+	+	++

a) Planta não existente em 2017

b) Amostra perdida

Assim, das 347 amostras analisadas, houve 30 (8,65%) cujos resultados para o GLRaV-3 em 2017 foram negativos e que em 2013 estavam positivos para o vírus.

Apesar de não ser uma percentagem elevada, esta ocorrência indica que é possível que a temperatura elevada tenha sido responsável pela alteração do estado sanitário das plantas, em relação a este vírus, como se suspeitava.

3.2 – Relação entre estado sanitário e desenvolvimento de sintomas

Foram observadas situações em que os resultados do teste ELISA realizado em 2017 foram positivos para a presença de GLRaV-3 e que, no entanto, as plantas não apresentam os sintomas típicos deste vírus. Tal verificou-se nas plantas do clone 1001-41 da casta Lameiro em que os resultados do teste ELISA em 2017 foram positivos fortes e apresentavam um ligeiro enrolamento aquando da recolha das amostras, no entanto nas fotografias tiradas a 19 de julho de 2018 observa-se que as mesmas plantas não manifestaram de sintomas (as fotos seguem em anexo). O mesmo sucedeu-se no clone 1005-16 também da casta Lameiro (ELISA 2017: maioritariamente positivos com apenas uma amostra negativa), no clone 1009-60 da casta Padeiro (ELISA 2017: positivos fortes), no clone 1009-64 da casta Esganoso (ELISA 2017: positivos fortes e apenas um positivo fraco) e no clone 2047-33 da casta Pintosa (ELISA 2017: um positivo e as restantes amostras positivos fortes) em que apesar dos resultados positivos e pouca expressão de sintomas no momento da recolha das amostras, as plantas em 2018 não apresentam os sintomas caraterísticos do vírus (fotos no ficheiro fotográfico em CD). Outro caso semelhante foi o do clone 1002-57 da casta Pintosa onde os resultados do teste ELISA de 2017 foram maioritariamente positivos fortes e aquando da recolha das amostras apenas 4 das amostras evidenciavam um ligeiro enrolamento das folhas, sendo que as restantes amostras apesar de positivos fortes não apresentavam qualquer sintoma. Podemos verificar através das fotografias em anexo que no Verão de 2018 as plantas deste mesmo clone não apresentaram sintomas.

Por outro lado, foram observados também alguns clones, como o 2014-08 (casta Padeiro), 2034-04 (casta Espadeiro) e o 2041-02 (casta Batoca), que no teste ELISA de 2017 mostraram estar infetados com GLRaV-3 e manifestaram os sintomas caraterísticos no dia 19 de julho de 2018 (ficheiro fotográfico no CD). Por sua vez o clone 1002-03 da casta Pintosa, que em 2013 obteve um positivo forte para a presença do GLRaV-3, deu resultados negativos no teste ELISA realizado em 2017, como já

referido anteriormente, e não apresenta atualmente qualquer sintoma do vírus como é esperado (fotos tiradas no dia 19 de julho de 2018).

3.3 – Concentração de vírus na zona apical e basal das plantas

A análise de variância para os valores de ELISA (Absorvância a 405nm), para a casta Pintosa (Quadro 12) mostra que a posição da amostra não teve efeitos significativos na concentração do vírus em nenhum dos genótipos (valor- $p < 0,05$).

Quadro 12 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Pintosa.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
2047-33	1,8902	1,7067	0,906	0,395
2047-52	1,0770	1,1462	0,103	0,764
2038-13	0,7191	0,6339	0,190	0,678

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor- $p < 0,05$, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

Na casta Batoca (Quadro 13) vê-se que existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus apenas no clone 2046-10, uma vez que apenas este tem um valor- $p < 0,05$. Neste clone as médias das amostras A (basais) são superiores às das amostras B (apicais) tal como era esperado.

Quadro 13 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Batoca.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
2036-16	0,0110	0,0123	0,023	0,884
2036-17	0,3953	0,4103	0,019	0,896
1003-88	0,0347	0,0323	0,038	0,855
1002-04	2,2370	1,7855	1,794	0,229
2046-10	1,7067	0,5487	99,49	0,001

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor- $p < 0,05$, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

Na casta Esganoso (Quadro 14), para os 3 clones estudados não se verificaram efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (valor- $p > 0,05$), ou seja, as médias amostrais das posições basal e apical não diferem significativamente.

Quadro 14 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Esganoso.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
2020-13	0,4883	0,4513	0,102	0,766
2042-97	0,0413	0,04975	0,504	0,505
2042-04	0,2279	0,1273	0,582	0,488

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor- $p < 0,05$, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

No Quadro 15 podemos ver que, para um nível de significância de 0,05, no clone 1009-130 a posição da amostra na planta teve influência na concentração de vírus observada nas mesmas, havendo também uma grande diferença nas médias amostrais. Esta diferença, no entanto, não é a prevista uma vez que o esperado seria uma média das amostras basais (A) superior à das apicais (B). No clone 1005-16 a análise de variância mostrou que a concentração de vírus não foi influenciada pela posição da amostra.

Quadro 15 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Lameiro.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
1005-16	0,5045	0,5885	0,148	0,714
1009-130	0,5437	1,0357	7,727	0,050

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor- $p < 0,05$, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

Na casta Espadeiro, tanto no clone 2034-04 como no clone 2022-51 (Quadro 16) a concentração do vírus variou com a posição da amostra (valor- $p < 0,05$), sendo que apenas no último essa variação foi a esperada (maior concentração na amostra basal que na apical). Para os restantes clones o mesmo não se verificou.

Em nenhum dos genótipos da casta Padeiro (Quadro 17) a posição da amostra teve efeitos significativos na concentração do vírus (valor- $p > 0,05$).

Quadro 16 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Espadeiro.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
2029-80	0,0507	0,0370	0,245	0,647
2014-52	0,2953	0,2540	0,435	0,534
2014-06	0,8635	0,8368	0,018	0,898
2034-04	0,9210	1,7533	25,010	0,007
2022-51	0,2258	0,0435	56,490	0,000287

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor-p <0.05, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

Quadro 17 - Resultados da análise de variância aos efeitos da posição da amostra na planta (posição basal (A) e apical (B)) na concentração do vírus para a casta Padeiro.

Genótipo	Média amostra A	Média amostra B	Fcalc	Valor-p
2014-25	0,6422	0,4470	0,591	0,471
1009-60	1,0570	1,0520	0,001	0,979
2014-07	0,7030	0,4053	1,257	0,325
2014-51	0,3173	0,6263	0,773	0,429
2014-31	1,4130	1,5508	0,673	0,443

Valor calculado da estatística do teste (Fcalc) aos efeitos da posição da amostra e respetivo valor-p. Quando é obtido valor-p <0.05, existem efeitos significativos da posição da amostra na concentração do vírus (as duas médias amostrais diferem significativamente).

Num total de 23 clones para os quais se realizou a análise de variância para os valores de ELISA (Absorvância a 405nm) apenas 4 clones (17,39%) mostraram que a posição da amostra teve influência na concentração de GLRaV-3 nas plantas. Destes 4 clones, apenas 2, tiveram a variação de concentração que, inicialmente se esperava, uma vez que o previsto seria uma concentração menor de GLRaV-3 nas extremidades apicais das plantas face à zona basal.

Como já foi referido, alguns lançamentos das plantas analisadas tinham as extremidades cortadas, pelo que não foi possível recolherem-se amostras de tecido apical nestes casos, este fator pode ter exercido alguma influência sobre os resultados obtidos.

Capítulo 4 – Conclusões

A vinha pode ser alvo de várias pragas e doenças parasitárias, entre elas diversas viroses. Atualmente, estão identificados vários vírus responsáveis por algumas dessas patologias da videira embora apenas alguns sejam realmente prejudiciais. A doença do enrolamento foliar da videira é a virose que está mais expandida pelas vinhas portuguesas, sendo *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV3) o vírus mais difundido.

O objetivo desta dissertação é auferir se ocorre uma possível “termoterapia natural” em relação a GLRaV-3 nas plantas que se encontram no Pólo de Conservação da Diversidade da Videira da PORVID, em Pegões, devido às elevadas temperaturas observadas na região. Conclui-se que, apesar de representarem uma pequena percentagem (8,65%), existem casos de plantas que já estiveram comprovadamente infetadas pelo GLRaV-3 em 2013 e no ano de 2017, após sujeitas ao teste ELISA, revelaram-se isentas do vírus. Estes resultados vêm fundamentar a hipótese colocada de que as temperaturas elevadas de verão na região de Pegões são responsáveis por uma “termoterapia natural” nas videiras. A eliminação de GLRaV-3 nas plantas por ação das temperaturas elevadas em campo pode vir a ser uma ferramenta de extrema utilidade para a diminuição da expressão dessa doença e pode trazer vantagens económicas. Para a viticultura e para os trabalhos a decorrer na PORVID é muito positivo que este fenómeno aconteça uma vez que vai de encontro aos objetivos da seleção clonal de proporcionar a utilização do melhor potencial genético da videira bem como a ausência dos mais importantes vírus da videira. São necessários mais estudos para que se possa compreender se é possível otimizar o uso dessa ferramenta de forma que possa ter viabilidade em campo.

Para além da eliminação dos vírus em algumas amostras, os casos de plantas infetadas por GLRaV-3 cujos sintomas não se manifestaram mostram a inibição sintomática por elevadas temperaturas sobre plantas com esta doença, tal como muitos estudos já mostraram.

Na análise de variância realizada para os valores de ELISA (Absorvância a 405nm), apenas 4 clones revelaram existir uma variação significativa da presença de vírus em função da posição da amostra na planta. Para além disso esta variação não

ocorreu de forma coerente uma vez que em 2 clones as médias da concentração de vírus foram maiores nas amostras basais e nos outros 2 aconteceu o oposto. Alguns resultados podem ter sido influenciados pelo facto de em algumas plantas não ter sido possível recolher amostras apicais, sendo colhidas as folhas mais jovens encontradas pelo que estes estudos terão que ser aprofundados. Também teria sido vantajoso se todos os clones analisados tivessem as 4 plantas disponíveis, o que permitiria que a análise de variância abrangesse a amostragem na sua totalidade. Por todos os motivos referidos, os resultados são ainda pouco conclusivos quanto aos efeitos da posição da amostra na concentração de GLRaV-3 e quanto à forma como este se distribui na planta.

Referências bibliográficas

- Atallah, S. S., Gómez, M. I., Fuchs, M. F., & Martinson, T. E. (2012). Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 73-79. Doi: 10.5344/ajev.2011.11055
- Basso, M. F., Fajardo, T. V., Saldarelli, P. (2017). Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017411>
- Bell, V. A., Chooi, K., Blouin, A. G., Cohen, D., Pietersen, G., & MacDiarmid, R. (2015). GLRaV-3 in New Zealand: biological impact and timing of the symptoms influences on the management strategies. In *Proceedings of the 18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Ankara, Turkey (pp. 40-41).
- Bell, V. A., Blouin, A. G., Cohen, D., Hedderley, D. I., Oosthuizen, T., Spreeth, N., Lester, P.J., & Pietersen, G. (2017). Visual symptom identification of grapevine leafroll-associated vírus 3 in red berry cultivars supports vírus management by roguing. *Journal of Plant Pathology*, 99:1-17. Doi: 10.4454/jpp.v99i2.3877
- Bester, R., Aldrich, D. J., Burger, J. T. & Maree, H. J. (2018). Variable concentration ratios of Grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 118-119).
- Bettencourt, S., Simões, A. M. Á., & Pereira, A. M. N. (2009). Identificação de vírus em videiras nas ilhas do Pico e Terceira (Açores). *Revista de Ciências Agrárias*, 32(2), pp. 14-22.
- Camargo, U. A., Tonietto, J., & Hoffmann, A. (2011). Progressos na viticultura brasileira. *Embrapa Uva e Vinho-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Chooi, K. M., Blouin, A. G., Cohen, D., Bell, V. A., Mundy, D., Nobilo, S. & MacDiarmid, R.M. (2018). The influence of Grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants on management initiatives in *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 120-121).
- Cid, M., Pereira, S., Cabaleiro, C., Faoro, F., & Segura, A. (2007). Presence of Grapevine leafroll-associated virus 3 in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 23-30. Doi: 10.1007/s10658-006-9090-8
- Cieniewicz, E., & Fuchs, M. (2007). Grape leafroll disease. Integrated Pest Management, Cornell University. <https://hdl.handle.net/1813/43103>
- CIVPP. (n.d.). *Batoca*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/batoca/> (Consultado a 11/06/2019)
- CIVPP. (n.d.). *Esganoso*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/esganoso/> (Consultado a 11/06/2019)

- CIVPP. (n.d.). *Espadeiro*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/espadeiro/> (Consultado a 11/06/2019)
- CIVPP. (n.d.). *Lameiro*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/lameiro/> (Consultado a 11/06/2019)
- CIVPP. (n.d.). *Padeiro*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/padeiro-padeiro-de-basto/> (Consultado a 11/06/2019)
- CIVPP. (n.d.). *Pintosa*. <https://www.cipvv.pt/pt/castas/pintosa/> (Consultado a 11/06/2019)
- Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), pp. 475-483.
- Cooper, M. L., Daugherty, M. P., Jeske, D. R., Almeida, R. P., & Daane, K. M. (2018). Incidence of grapevine leafroll disease: Effects of grape mealybug (*Pseudococcus maritimus*) abundance and pathogen supply. *Journal of economic entomology*, 111(4), 1542-1550.
- Cortez, I., (2002). *Diagnóstico de Vírus em Fitopatologia*. Série Didática, Ciências Aplicadas, Nº 188, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Cuozzo, D., Chitarra, W., Ferrandino, A., Gribaudo, I., Gambino, G. & Mannini, F. (2018). Field performances and grape quality of the same clone of 'Nebbiolo' (*Vitis vinífera* L.) when infected by GLRaV-1+GVA, GVA or healthy. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 140-141).
- Eiras-Dias, J., Faustino, R., Clímaco, P., Fernandes, P., Cruz, A., Cunha, J. & Veloso, M. (2011). *Catálogo das castas para vinho cultivadas em Portugal - Volume I*. 1ª Edição. Instituto da Vinha e do Vinho I.P.
- Eiras-Dias, J., Faustino, R., Clímaco, P., Fernandes, P., Cruz, A., Cunha, J. & Veloso, M. (2013). *Catálogo das castas para vinho cultivadas em Portugal - Volume II*. 1ª Edição. Instituto da Vinha e do Vinho I.P.
- Ito, T., & Nakaune, R. (2016). Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of virology*, 161(9): 2555-2559. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1176-8>
- Magalhães, N. (2015). *Tratado de Viticultura: A Videira, A Vinha e o "Terroir"*. 2ª edição. Editora Esfera Poética.
- Mahfoudhi, N., Digiaro, M., & Dhouibi, M. H. (2009). Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Disease*, 93: 999-1002. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-0999>

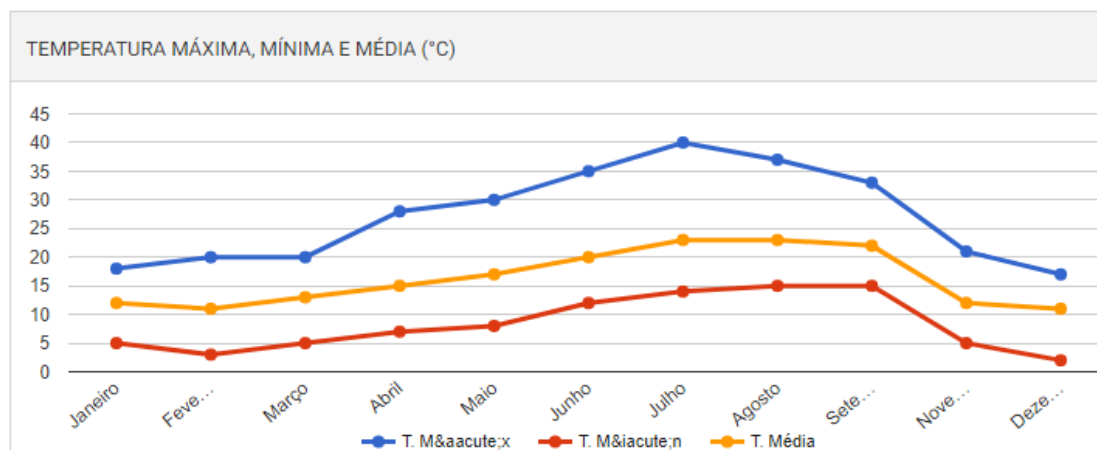
- Maliogka, V. I., Martelli, G. P., Fuchs, M., & Katis, N. I. (2015). Control of viruses infecting grapevine. *Advances in Virus Research* 91: 175-227. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>
- Mannini, F., & Digiario, M. (2017). The effects of viruses and viral diseases on grapes and wine. In *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (pp. 453-482). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_23
- Maree, H. J., Almeida, R. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E. C., Martelli, G. P., Naidu, R. A., Rowhani, A., Saldarelli, P., & Burger, J. T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1-21. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00082
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, O., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C. & N. Yoshikawa. (2002). The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147: 2039–2044. <https://doi.org/10.1007/s007050200048>
- Martelli, G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96: 1-136.
- Martelli, G. P. (2017). An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause. In B. Meng et al. (eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 31-46). Cham, Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-319-57706-7_2
- Martelli, G. P. (2018). Where Grapevine Virology is Heading To. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Santiago, Chile* (pp. 10-15).
- Martins A, Gonçalves E (2015). Grapevine breeding programmes in Portugal. In *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry: Traditional and Molecular Techniques*. A. G. Reynolds ed., Woodhead Publishing Elsevier, UK, 159-182.
- McGreal, B., Sandanayaka, M., Chooi, K. M., MacDiarmid, R. M. (2018). Grapevine leafroll-associated virus 3 retention and transmission by *Pseudococcus calceolariae*. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Santiago, Chile* (pp. 18-19).
- Montero, R., El aou ouad, H., Pacifico, D., Marzachi, C., Castillo, N., García, E., Del Saz, N.F., Florez-Sarasa, I., Flexas, J., & Bota, J. (2017). Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology in asymptomatic plants of *Vitis vinifera*. *Annals of applied biology*, 171: 155-171. <https://doi.org/10.1111/aab.12356>
- Mota, T. & Silva, F. (1986). *O Catálogo das Castas da Região dos Vinhos Verdes*. Tipografia Guerra.
- Moutinho-Pereira, J., Correia, C. M., Gonçalves, B., Bacelar, E. A., Coutinho, J. F., Ferreira, H. F., Lousada, J. L. & Cortez, M. I. (2012). Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and-3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar “Touriga Nacional” growing under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 160: 237-249. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00536.x>

- Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., & Martelli, G. P. (2014). Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, 98: 1172-1185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE>
- O Tempo. (n.d.). *Histórico do tempo para Setúbal*. <https://www.tempo.pt/setubal-sactual.htm> (Consultado em 16/06/2019)
- Pagay, V., Habili, N., Wu, Q., Coleman, D. (2018). Rapid and non-destructive detection of Shiraz disease and grapevine leafroll disease on asymptomatic grapevines in Australian vineyards. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 34-35).
- Pisapia, P., Cieri, M., Pepe, F., Malapelle, U., & Troncone, G. (2019). DNA-Based Sequencing Assays. *Molecular Diagnostics in Cytopathology* (pp. 83-97). Springer, Cham. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-97397-5_5
- PORVID (2015). *Seleção da videira: Guia para a escolha de material (clones) a plantar*. <http://www.advid.pt/imagens/outros/14459492743718.pdf> (Consultado em 24/10/2018)
- PORVID (2018). *Catálogo de Clones Seleccionados 2018*. <http://www.advid.pt/imagens/outros/15256884712211.pdf> (Consultado em 24/10/2018)
- Reynard, J. S., Gugerli, P. (2018). Is Grapevine leafroll-associated virus 7 associated with leafroll disease? In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 124-125).
- Ruiz, V. S. (2011). Advances in grape culture worldwide. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33. 131-143. Doi: 10.1590/S0100-29452011000500016
- Rwahn, M. A. (2018). High Throughput Sequencing as a tool for viral pathogen diagnosis and expedited release of quarantined propagative plant material- current prospect and challenges. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (p. 58).
- Sánchez-Navarro, J. A., Fiore, N., Zamorano, A., Martins Fajardo, T. V., Pallás, V. (2018) Simultaneous detection of the 13 viruses and 5 viroids affecting grapevine by molecular hybridization using a unique probe or ‘polyprobe’. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 40-41).
- Shabanian, M., Xiao, H., Meng, B. (2018). Temporal dynamics and spatial distribution of major grapevine viruses under cool climate field conditions in Ontario, Canada. In *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile (pp. 26-27).
- The R Foundation. (n.d.). Consultado em 05/05/2019, de <https://www.r-project.org/>
- Tsai, C. W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K. M., & Almeida, R. P. P. (2008). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98: 1093-1098. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-10-1093>

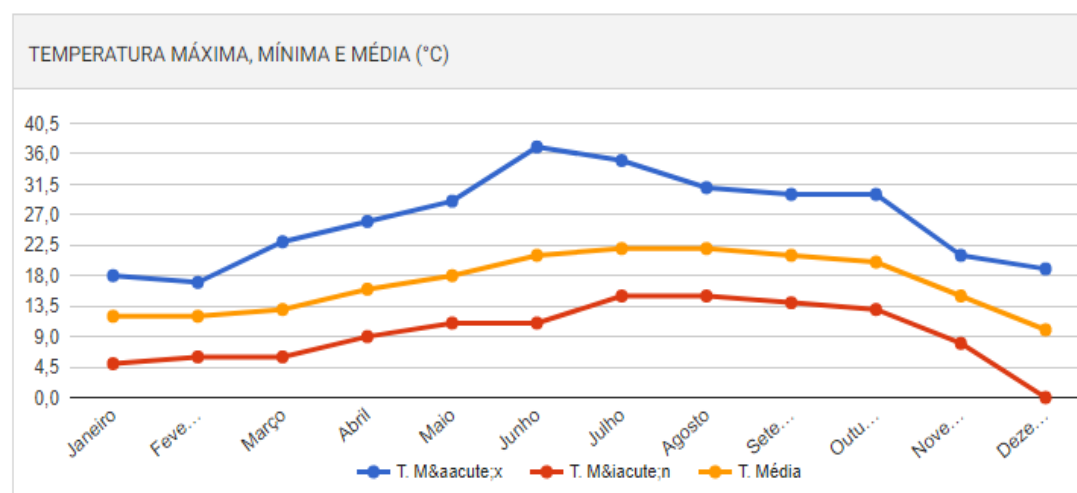
- Tsai, C. W., Rowhani, A., Golino, D. A., Daane, K. M., & Almeida, R. P. (2010). Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus–vector specificity. *Phytopathology*, 100: 830-834. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0830>
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & McCartney, H. A. (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145: 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x>
- White, P. (2009, Novembro 6). The Noah's ark of wine. *Decanter*. Disponível em: <https://www.decanter.com/features/portugals-indigenous-varieties-246586/> (Consultado a: 17/02/2019)

ANEXO

Temperaturas observadas na região de Setúbal em 2013. Fonte: O tempo, n.d.



Temperaturas observadas na região de Setúbal em 2017. Fonte: O tempo, n.d.



Temperaturas observadas na região de Setúbal em 2014 (de Maio a Dezembro.) Fonte: O tempo, n.d.

