

# CARATERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Phaeomoniella chlamydospora* OBTIDOS NA REGIÃO DEMARCADA DO DÃO.

Jorge SOFIA<sup>1,3\*</sup>; João TROVÃO<sup>1\*</sup>; António PORTUGAL<sup>1</sup>; Hugo PAIVA DE CARVALHO<sup>1</sup>; Nuno MESQUITA<sup>1</sup>; Teresa NASCIMENTO<sup>2</sup>; Cecília REGO<sup>2</sup>; Maria Teresa GONÇALVES<sup>1</sup>

## RESUMO

Sessenta e oito isolados de *Phaeomoniella chlamydospora*, obtidos maioritariamente na região demarcada do Dão, a partir de videiras com sintomas de esca e de doença de Petri, foram analisados quanto à sua diversidade fenotípica e molecular a fim de apurar a variabilidade intraespecífica. Foram avaliados parâmetros fenotípicos das colónias dos isolados, tais como textura, cor, diâmetro, zonagem, tipo de margem e ainda a morfologia das hifas. A caracterização molecular incidiu na sequenciação da região ITS total e alinhamento das sequências, tendo sido feitas análises moleculares com o objetivo de inferir relações filogenéticas entre os isolados, usando o método de ML (*Maximum Likelihood*).

Tanto as análises fenotípica como molecular diferenciaram dois grupos de isolados, não coincidentes entre si. As análises revelaram igualmente uma elevada homogeneidade entre os isolados, independentemente da sua origem geográfica, do ano de isolamento e da combinação casta / porta-enxerto. Em suma, a hipótese de uma estratégia de reprodução clonal para esta espécie foi novamente comprovada para a população de *Phaeomoniella chlamydospora* em estudo.

Palavras-chave: esca; doença de Petri; *Vitis vinifera*; diversidade genética; sequenciação; região ITS

## 1 - INTRODUÇÃO

A esca é considerada, na região demarcada do Dão, à semelhança do que acontece noutras regiões vitícolas do globo a sua mais importante doença do lenho (TOMÁZ *et al.*, 1989; SOFIA *et al.*, 2006, 2013). Trabalhos recentes identificam *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingfield & Mugnai) Crous & W. Gams e *Phaeoacremonium* spp. (principalmente *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai), como os mais importantes agentes patogénicos relacionados com o complexo da esca e da sua manifestação em plantas jovens (doença de Petri) (CROUS e GAMS, 2000). Contudo, *P. chlamydospora* é a espécie isolada com maior frequência (MUGNAI, 1998; CLEARWATER *et al.*, 2000; PASCOE e COTTRAL, 2000; WHITEMAN *et al.*, 2002), sendo por isso considerada como a principal associada à doença de Petri (RIDGWAY *et al.*, 2005; LAVEAU *et al.*, 2009; POUZOULET *et al.*, 2013).

TELLO *et al.* (2010) efetuaram a caracterização fenotípica de 57 isolados de *P. chlamydospora* de origem espanhola, tendo verificado haver homogeneidade fenotípica entre todos os isolados estudados, independentemente da sua origem geográfica, ano de isolamento ou da combinação porta-enxerto/casta.

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA é a região mais frequentemente sequenciada em fungos (PEAY *et al.*, 2008) e, tem sido repetidamente proposta como o

<sup>(1)</sup> Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-446, Coimbra, Portugal.

<sup>(2)</sup> Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

<sup>(3)</sup> Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, Estação Agrária de Viseu, Estação de Avisos do Dão, 3504-504 Viseu, Portugal. [jorge.sofia@drapc.min-agricultura.pt](mailto:jorge.sofia@drapc.min-agricultura.pt)

\* Estes autores contribuíram de igual forma para o presente trabalho.

marcador universal primário de fungos, devido à alta precisão na identificação de fungos e a forte definição entre variação interespecífica e intraespecífica que permite obter (KORABECNA, 2007; SCHOCH *et al.*, 2012). Adicionalmente, a utilidade da região ITS já foi demonstrada para a classificação taxonômica correta de *P. chlamydospora* (CROUS e GAMS, 2000).

Sem teleomorfo descrito para *P. chlamydospora* até à data, é geralmente aceite que a reprodução desta espécie é estritamente clonal, sendo esta estratégia de reprodução suportada pela elevada homogeneidade das populações estudadas em diferentes locais geográficos, com destaque para Espanha (COBOS e MARTÍN, 2008; TELLO *et al.*, 2010), França (BORIE *et al.*, 2002; SMETHAM *et al.*, 2010), Itália (TEGLI *et al.*, 2000a, 2000b), África do Sul (MOSTERT *et al.*, 2006) e Nova Zelândia (POTTINGER *et al.*, 2002; SMETHAM *et al.*, 2010).

TEGLI *et al.* (2000a), recorrendo a análises por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat Analysis), reportaram um elevado nível de homogeneidade genética entre 15 isolados italianos. BORIE *et al.* (2002) descreveram idênticos níveis de diversidade entre, respetivamente, 72 e 34 isolados, provenientes de duas regiões francesas distintas, recorrendo também à análise por RAPD; reportando também o mesmo com 47 isolados provenientes de uma mesma vinha francesa. Recorrendo a análises por RAPD, ISSR, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e UP - PCR (Universally Primed - Polymerase Chain reaction), POTTINGER *et al.* (2002) verificaram que baixos valores de variabilidade genética ocorriam entre 39 isolados neozelandeses e seis de origem italiana, sugerindo a ocorrência de múltiplas introduções de populações fúngicas estrangeiras nas vinhas da Nova Zelândia. MOSTERT *et al.* (2006), usando AFLP, concluíram que populações da África do Sul, Austrália, França, Irão, Itália, Nova Zelândia, Eslovénia e EUA, apresentavam pequena diversidade genética. Verificou-se também que a variabilidade genética entre diferentes regiões de produção não era significativa, concluindo que as infeções tinham sido causadas por diferentes fontes de inóculo. COBOS e MARTÍN (2008) e TELLO *et al.* (2010) reportaram baixa diversidade genética entre, respetivamente, 35 e 57 isolados espanhóis, recorrendo a ISSR, RAPD e pela análise da região ITS, dos genes da  $\beta$ -tubulina e EF1 $\alpha$  (elongation factor 1- $\alpha$ ). Recentemente, SMETHAM *et al.* (2010) utilizando 60 isolados do sul da Austrália e 67 provenientes do sul de França, analisaram os *loci* de 18 microssatélites, concluindo estarem perante uma situação de baixa recombinação genética e que estas populações possuíam essencialmente uma estrutura clonal.

O presente estudo tem como objetivo a avaliação e divulgação nacional da variabilidade morfológica e molecular intraespecífica de uma coleção de 68 isolados de *P. chlamydospora* portugueses dos quais 47 da região demarcada do Dão.

## **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

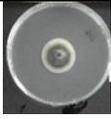
No presente trabalho foram analisados 68 isolados de *P. chlamydospora* maioritariamente provenientes da região do Dão (SOFIA *et al.*, 2015) e obtidos a partir de plantas com sintomas de esca ou de doença de Petri. O isolamento foi efetuado a partir das típicas lesões no lenho de cor negra, normalmente associadas à presença deste agente patogénico (LARIGNON e DUBOS, 1997) em meio de malte agarizado a 2% (MA, Difco, Beckton, Dickinson e Co.). Os procedimentos efetuados para a caracterização fenotípica das culturas (aspeto cultural, coloração, frente de crescimento, zonagem e a morfologia das hifas) e caracterização molecular estão descritos em SOFIA *et al.* (2015). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (com os números de acesso: KP886950 – KP887017) tendo sido comparadas com as sequências das bases de dados de nucleótidos do “National Center of Biotechnology Information” recorrendo à ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)”. Para a análise filogenética, utilizou-se como “outgroup” *Eutypa lata* (Genbank: KF453558.1).

## **3 - RESULTADOS**

### **3.1 - Caracterização fenotípica**

Após um período de incubação de 30 dias, em 2% MA, sob condições de obscuridade e temperatura de 25 °C, todos os isolados em estudo (68 isolados) formaram as culturas típicas de *P. chlamydospora*. Variações observadas na morfologia das culturas permitiram o estabelecimento de dois grupos distintos (Tabela 1): o grupo I com 45 isolados que se caracterizava por ter micélio feltroso, verde-oliváceo, frente de crescimento regular e com predomínio de hifas filamentosas e micélio aéreo ralo e, o grupo II, com os restantes 23 isolados, que apresentava micélio feltroso, verde-oliváceo com frente de crescimento branca, crescimento regular e com predomínio de hifas filamentosas e micélio aéreo ralo. Todos os isolados produziram conídios e clamidósporos típicos da espécie, com taxas de esporulação, taxas diárias de crescimento micelial e diâmetros médios de culturas registadas na Tabela 2.

**Tabela 1** - Características culturais e morfológicas de 68 isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* em 2% MA (malte agar) ao fim de 30 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25 °C

Grupo	Isolados	Culturas em MA <sup>a</sup>	Aspetto cultural	Cor	Frente de crescimento	Zonagem	Morfologia das hifas e micélio
I	1, 2, 3, 4, 5, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65 68, 69		feltroso	verde-oliváceo	regular	ausente	predominam hifas filamentosas com micélio aéreo ralo
II	6, 7, 8, 10, 11, 12, 19, 20, 25, 29, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 41, 46, 54, 57, 63, 66, 67		feltroso	verde-oliváceo, frente de crescimento branca	regular	ausente	predominam hifas filamentosas com micélio aéreo ralo

<sup>a</sup> - 2% malte agar, face superior

**Tabela 2** - Valores médios, máximos e mínimos, da taxa de crescimento micelial diária (mm), a 25 °C, sob condições de obscuridade e, do crescimento micelial (mm) a 25 °C, ao fim de 30 dias, sob condições de obscuridade para o conjunto de 68 isolados *Phaeomoniella chlamydospora* em estudo

Parâmetros fenotípicos	Média ± s <sup>a</sup>		Máximo		Mínimo	
	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II
Taxa de crescimento micelial diária	0,68 <sup>ns</sup> ± 0,13	0,68 <sup>ns</sup> ± 0,11	0,98	0,93	0,48	0,50
Crescimento micelial ao fim de 30 dias	20,54 <sup>ns</sup> ± 3,90	20,52 <sup>ns</sup> ± 3,50	29,3	27,87	14,31	14,83

<sup>a</sup> - valores médios ± desvio padrão de dois conjunto de seis réplicas para cada isolado;

<sup>ns</sup> - valores não significativamente diferentes calculados usando teste t ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3.2 - Identificação molecular e caracterização filogenética

As sequências da região ITS obtidas foram comparadas com as sequências de referência de *P. chlamydospora* depositadas na base de dados do NCBI. Para o conjunto dos isolados estudados obtiveram-se valores de coeficiente de similaridade de 99%, para todas as sequências com exceção do isolado 61 que apresentava um coeficiente de similaridade de 100%. Estes valores são adequados para a identificação molecular dos isolados (LANDEWEERT *et al.*, 2003). A sequência ITS completa de cada isolado foi analisada para inferir possíveis relações intraespecíficas recorrendo à estimativa por ML (*Maximum Likelihood*) (Figura 1).

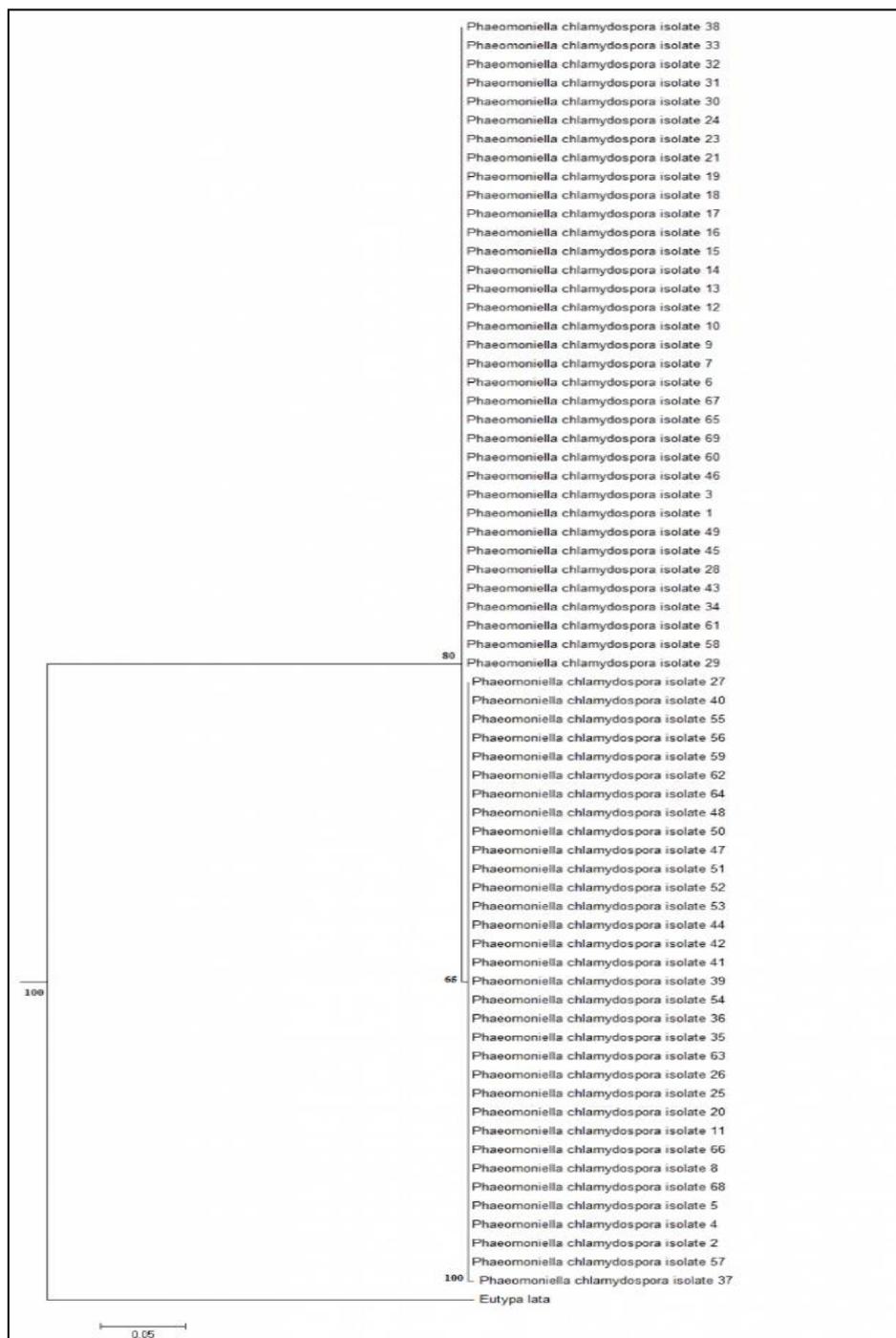


Figura 1 - Árvore de “Maximum Likelihood” após alinhamento das 68 sequências da região ITS obtidas neste estudo com *Eutypa lata* (KF453558) como “outgroup”. As percentagens de “bootstrap” são indicadas para cada 1000 interações e a escala é representativa de substituições por local/site.

Os resultados mostram uma separação entre dois grupos distintos: um grupo de 33 isolados com um “bootstrap” de 65% e um segundo grupo de 35 isolados separados do primeiro grupo com um “bootstrap” de 80%. A separação destes dois grupos ocorreu devido a um

SNP (Simple Nucleotide Polymorphism), nas posições 429 (T/A) e 497 (T/C). Verificou-se que um SNP na posição 534 (C/A) separava o isolado 37 do resto do seu grupo (“bootstrap” de 100%).

#### **4 - DISCUSSÃO**

Vários estudos analisaram isolados de *P. chlamydospora* obtidos em Portugal (CHICAU *et al.*, 2000; REGO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2006; SOFIA *et al.*, 2013), fornecendo, contudo, pouca informação sobre a variabilidade fenotípica e molecular da espécie, pelo que no presente trabalho se efetuou o estudo de 47 isolados de *P. chlamydospora* provenientes do Dão e 21 de outras regiões vitivinícolas portuguesas.

Verificou-se pequena variação fenotípica entre os 68 isolados de *P. chlamydospora* provenientes do Dão e de outras regiões vitícolas portuguesas. Vários trabalhos, focando as características morfológicas de isolados de *P. chlamydospora* conduzidos em diferentes países, demonstraram um baixo grau de variação fenotípica (DUPONT *et al.*, 1998; WHITING *et al.*, 2001, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; TELLO *et al.*, 2010). COMONT *et al.* (2010), em França, reportaram a coexistência de duas linhagens clonais predominantes. Contudo as características morfológicas analisadas permitiram agrupar os 68 isolados em dois morfotipos de acordo com o aspeto macromorfológico das culturas. Nos grupos formados, os isolados do Dão surgem par a par com isolados de outras regiões, não havendo uma correspondência evidente com a combinação porta-enxerto/casta, ano de isolamento ou origem geográfica.

TELLO *et al.* (2010), trabalhando com isolados de origem espanhola e SOFIA *et al.* (2013), com isolados portugueses, verificaram maiores taxas de esporulação e de crescimento diário, face aos obtidos no presente trabalho. Estas diferenças serão provavelmente devidas à utilização de um meio de cultura mais pobre e que, contrariamente ao meio utilizado em TELLO *et al.* (2010), não proporciono taxas de esporulação e crescimento superiores às obtidas.

A baixa variabilidade fenotípica observada nas populações portuguesas de *P. chlamydospora* será, provavelmente, uma consequência da predominância da reprodução clonal associada a esta espécie dando a indicação de que diferentes critérios serão necessários para diferenciar a estrutura da população de grandes conjuntos de isolados.

A análise das sequências ITS agrupou os 68 isolados em dois grupos distintos tendo em conta modificações nos nucleótidos nas posições 429 (T/A) e 497 (T/C). Resultados semelhantes foram verificados para populações espanholas por COBOS e MARTÍN

(2008), com as diferenças ocorrendo nas posições 369 (T/A) e 438 (T/C). Verificou-se também que o isolado 37 se encontrava separado do grupo II por um SNP na posição 534 (C/A). As trocas (T/A) e (T/C) parecem, de uma forma preliminar, estar presentes em várias populações mundiais e serem os SNPs dominantes para esta espécie (dados não publicados).

Uma vez que três linhagens clonais de *P. chlamydospora* foram detetadas, os resultados sugerem que diferentes fontes de inóculo poderão ter sido introduzidas, nomeadamente através de material de propagação como porta-enxertos, enxertos-prontos e/ou garfos (RETIEF *et al.*, 2006; WHITEMAN *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos estão em concordância com estudos anteriormente realizados na Nova Zelândia, Espanha, Austrália e França (TEGLI *et al.*, 2000a, 2000b; BORIE *et al.*, 2002; POTTINGER *et al.*, 2002; MOSTERT *et al.*, 2006; COBOS e MARTÍN, 2008; SMETHAM *et al.* 2010; TELLO *et al.*, 2010). Verifica-se também não haver uma correlação entre os grupos formados de acordo com as características morfológicas e os “clusters” genéticos. A reprodução clonal tem sido descrita para esta espécie (TEGLI *et al.*, 2000a, 2000b; BORIE *et al.*, 2002; POTTINGER *et al.*, 2002; MOSTERT *et al.*, 2006; COBOS e MARTÍN, 2008; SMETHAM *et al.*, 2010; TELLO *et al.*, 2010), no entanto, como sugerido por BORIE *et al.* (2002), recombinações por via de um ciclo parassexual podem ocorrer, explicando a pequena variabilidade genética encontrada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borie B., L. Jacquot, I. Jamaux-Despréaux, P. Larignon e J. Péros (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* 51, 85–96.
- Chicau G., M. Aboim-Ingles, S. Cabral e J. Cabral (2000). *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Phaeoacremonium angustius* associated with esca and grapevine decline in Vinho Verde grapevines in north-west Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 80–86.
- Clearwater L., A. Stewart e M. Jaspers (2000). Incidence of the black goo fungus *Phaeoacremonium chlamydosporum* in declining grapevines in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 53, 448.
- Cobos R. e M. Martín (2008). Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 47, 20–27.
- Comont G., M-F. Corio-Costet, P. Larignon e F. Delmotte (2010). AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology* 127, 451–464.

- Crous P. e W. Gams (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112–188.
- Dupont J., W. Laloui e M. Roquebert (1998). Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. *Mycological Research* 102, 631–637.
- Korabecna M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene: its biological meaning and application in medical mycology. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (A. Méndez-Vilas, ed.), Formatex, Spain, 783–787.
- Landeweert R., P. Leeflang, T. Kuyper, E. Hoffland, A. Rosling, K. Wernars e E. Smith (2003). Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied Environmental Microbiology* 69, 327–333.
- Larignon P. e B. Dubos (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147–157.
- Laveau C., A. Letouze, G. Louvet, S. Bastien e L. GuérinDubrana (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 32–46.
- Mostert L., E. Abeln, F. Halleen e P. Crous (2006). Genetic diversity among isolates of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology* 35, 453–460.
- Mugnai L. (1998): A threat to young vineyards: *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Italy. In: *Black goo: Symptoms and occurrence of grape declines-IAS/ICGTD Proceedings*. (L. Morton, ed.), International Ampelography Society, Fort Valley, Virginia, USA, 35–42.
- Pascoe I. e E. Cottral (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 68–75.
- Peay K.G., P. Kennedy e T. Bruns (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58, 799–810. doi:10.1641/b580907.
- Pottinger B., A. Steward, M. Carpenter e H. Ridgway (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 199–211.
- Pouzoulet J., A. Jacques, X. Besson, J. Dayde e N. Mailhac (2013). Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 313–324.
- Rego C., H. Oliveira; A. Carvalho e A. Phillips (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 76–80.
- Retief E., A. McLeod e P. Fourie (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115, 331–339.
- Ridgway H., J. Steyaert, B. Pottinger, M. Carpenter, D. Nicol e A. Steward (2005). Development of an isolate-specific marker for tracking *Phaeomoniella chlamydospora* infections in grapevines. *Mycologia* 97, 1093–1101.
- Santos C., S. Fragoeiro, H. Valentim e A. Phillips (2006). Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme

- production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae* 107, 123–130.
- Schoch C., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. Spouge, C. Levesque e W. Chen (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 109, 6241–6246.
- Smetham G., P. Ades, J. Péros e R. Ford (2010). Genetic structure of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* in south-eastern Australia and southern France, *Plant Pathology* 59, 736–744.
- Sofia J., M. Gonçalves e H. Oliveira (2006). Spatial distribution of esca symptomatic plants in Dão vineyards (Centre Portugal) and isolation of associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S87–S92.
- Sofia J., T. Nascimento, M. Gonçalves e C. Rego (2013). Contribution for a better understanding of grapevine fungal trunk diseases in Portuguese Dão wine region. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 324–334.
- Sofia J., J. Trovão, A. Portugal, H. Paiva de Carvalho, N. Mesquita, T Nascimento, C. Rego, M. T. Gonçalves, (2015). Molecular and phenotypic characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). *Phytopathologia Mediterranea* 54, 403–413.
- Tegli S., E. Bertelli, E. Santilli e G. Surico (2000a). Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *Ph. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 125–133.
- Tegli S., E. Bertelli e G. Surico, (2000b). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 134–149.
- Tello M., D. Gramaje, A. Gómez, P. Abad-Campos e J. Armengol (2010). Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology* 92, 195–203.
- Tomáz I., M. Rego e P. Fernandes (1989). A esca, principal doença do lenho na região dos vinhos do Dão. *Vida Rural* 1474, 10–16.
- Whiteman S., M. Jaspers, A. Stewart e H. Ridgway (2002). Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species specific PCR. *New Zealand Plant Pathology* 55, 139–145.
- Whiteman S., A. Stewart, H. Ridgway e M. Jaspers (2007). Infection of rootstock mother-vines by *Phaeoconiella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36, 198–203.
- Whiting E., M. Cunha e W. Gubler (2005). *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species distinguished through cultural characters and ribosomal DNA sequence analysis. *Mycotaxon* 92, 351–360.
- Whiting E., A. Khan e W. Gubler (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85, 195–201.

O presente trabalho destina-se a divulgação nacional, reproduzindo parte de Sofia *et al.* (2015).