

Alterações na produção de compostos fenólicos em culturas de células de *Vitis vinifera* eliciadas por *Phaeomoniella chlamydospora*

Changes in phenolic production of *Vitis vinifera* cell cultures induced by *Phaeomoniella chlamydospora* elicitation

M. R. M. Lima, O. Guimarães, F. Ferreres¹, A. C. P. Dias

Departamento de Biologia da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

¹Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, CEBAS (CSIC), P.O. Box 4195, Murcia 30080, Spain

email: acpdias@bio.uminho.pt

Resumo

A esca é uma doença que afecta plantas da espécie *Vitis vinifera* levando a importantes perdas na produção de vinho. O fungo *Phaeomoniella chlamydospora* (PC) é frequentemente associado a plantas de videira com esca e declínio das vinhas. Informação sobre a interacção deste fungo com a esca e declínio das vinhas ainda é escassa.

Para estudar mecanismos de defesa da videira ao fungo PC utilizamos culturas *in vitro* de *Vitis vinifera* cv. Vinhão (Vv) eliciadas com biomassa autoclavada do fungo PC ou metiljasmonato (MeJ). Várias amostras foram tiradas durante o período experimental e a produção de compostos fenólicos por culturas de Vv foi analisada por HPLC-DAD e HPLC-MS/MS.

A produção de compostos fenólicos das células de Vv alterou-se significativamente após exposição a PC e MeJ. As culturas de células de Vv eliciadas por PC e MeJ aumentam a produção total de stilbenos, quando comparadas com o controlo, nomeadamente em compostos do tipo viniferinas. Estes compostos são substâncias de conhecida acção antifúngica podendo ser importantes na defesa da planta contra infecção por PC. Assim, as culturas *in vitro* de Vv podem ser uma ferramenta importante, uma vez que oferecem um meio simples, rápido e selectivo para estudar as interacções planta/esca.

Abstract

Esca is an important disease that affects *Vitis vinifera* plants leading to important losses in wine production. *Phaeomoniella chlamydospora* (PC) is a fungi frequently associated with esca and grapevine decline. Information on the interaction of this fungus with esca and grapevine decline is scarce.

To study the putative response of vitis plants to PC we utilized *in vitro* cultures of *Vitis vinifera* cv. Vinhão (Vv) elicited with fungi PC autoclaved extracts and methyl jasmonate (MeJ). Several culture samples were taken during experimental period and phenolic production was evaluated by HPLC-DAD and HPLC-MS/MS.

Phenolic production of Vv cells significantly changed after PC and MeJ (100 µM) exposure, leading to a differential production. Vv cell cultures elicited by PC and MeJ increase their stilbene production comparing to the control, namely in the viniferins type compounds. These compounds are known antifungal substances that could be important in plant defence against PC infection. So, *in vitro* cultures of Vv could be an important tool, since they offer a simple, rapid and selective way to study plant/esca interactions.

Introdução

A esca é uma doença destrutiva, de etiologia complexa, que afecta vinhas em todo o mundo, em particular no Mediterrâneo, África do Sul e Califórnia. Apesar dos sintomas da esca serem referenciados já em trabalhos gregos e latinos da antiguidade (Mugnai *et al*, 1999), nos últimos anos esta a doença está a tornar-se uma grande preocupação, dado o aumento dramático da sua incidência. Este aumento de incidência coincidiu com mudanças na gestão das vinhas e novas práticas de cultura com cuidados sanitários reduzidos do material de propagação, fraca protecção das feridas infligidas pela poda e a proibição de tratamentos com arsenito de sódio devido à sua toxicidade (Graniti *et al*, 2000).

A etiologia da esca ainda não é completamente compreendida. Vários microorganismos têm sido associados com a doença e pensa-se que ela é o resultado da acção destes microorganismos. De entre os microorganismos mais comumente isolados de vinhas com sintomas da esca destacam-se o *Phaeoconiella chlamydospora* (*Phaeoacremonium chlamydosporum*), *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phellinus punctatus*, *Phellinus igniarius*, *Stereum hirsutum*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria obtusa* e *Eutypa lata* (Mugnai *et al*, 1996, 1999; Larington and Dubos, 1997).

Ainda não é claro se estes microorganismos actuam em sucessão (sendo alguns destes fungos colonizadores primários que criam condições para outros fungos colonizarem a planta mais tarde) ou em associação (coexistência de duas doenças causadas por espécies de fungo diferentes na mesma planta) (Mugnai *et al*, 1999; Graniti *et al*, 2000).

Para estudar a resposta da videira ao fungo *Phaeoconiella chlamydospora*, utilizaram-se culturas *in vitro* de *Vitis vinifera* cv. Vinhão eliciadas com biomassa do fungo autoclavada e metiljasmonato. A produção de compostos fenólicos foi avaliada por HPLC-DAD e HPLC-MS/MS.

Material e Métodos

Meio e condições de cultura in vitro

As culturas de células em suspensão de *Vitis vinifera* foram mantidas a 25°C em meio líquido, composto por macronutrientes Gamborg B5 e micronutrientes Murashige e Skoog, contendo 2% de sacarose. O pH do meio foi ajustado a 6,0 antes de autoclavar. As culturas de *Vv* foram mantidas num fotoperíodo 16h/8h luz/escuro, sendo iluminadas por lâmpadas fluorescentes (Osram-Fluora) com fluxo de fotões de 30µmol/m²s e agitadas a 100 rpm. As células repicaram-se a cada 10 dias, transferindo-se 10mL de suspensão de células para balões com 70 ml de meio fresco.

Preparação da suspensão de fungo

O fungo *Phaeoconiella chlamydospora* foi mantido no escuro em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) sólido, sendo cultivado em meio líquido (26°C, 250 rpm) para obtenção de biomassa. Ao fim de 2 semanas de cultura, o fungo foi recolhido e liofilizado. Uma suspensão de fungo foi preparada ressuspensando a biomassa do fungo em água desionizada e de seguida autoclavada, durante 15 minutos (120°C, 15 lb/in²).

Eliciação de culturas de Vv

As culturas foram divididas em 3 grupos: um grupo controlo, um grupo ao qual foi adicionado metiljasmonato (Sigma, *St. Louis*, USA) numa concentração final de 100µM, ao 5º dia de cultura, e um grupo ao qual foi adicionada a suspensão de fungo (correspondente a 30mg de biomassa de fungo/balão de cultura), também ao 5º dia de cultura.

Preparação de amostras de culturas de Vv para análise por HPLC

Amostras de células de *Vv* foram recolhidas por centrifugação e liofilizadas durante 48h. A biomassa seca foi extraída com uma solução de metanol 70%, acidificado com ácido fórmico (0,5%), no escuro, durante 1 dia. De seguida a fase líquida foi filtrada e as amostras foram guardadas para posterior análise por HPLC-DAD.

A separação dos compostos foi efectuada num sistema cromatográfico Beckman Gold, equipado com uma coluna RP18 (250x4mm, 5µm, Merck). A quantificação dos compostos do tipo piceído e viniferina foi feita a 306nm, em equivalentes de resveraterol, pelo método do padrão externo.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o programa GraphPadPrism versão 4.00 para *Windows XP* (GraphPad Software Inc., San Diego California, USA).

Resultados

Os perfis cromatográficos, a 306nm, de culturas de células de *Vv* encontram-se representados na figura 1. Nas culturas controlo os principais compostos produzidos são stilbenos do tipo piceído (figura 1A). No entanto, quer a eliciação com biomassa do fungo *Pc*, quer a eliciação com MeJ, induzem mudanças significativas nos perfis cromatográficos (figura 1B e 1C, respectivamente). Nestas duas últimas condições verifica-se o aparecimento novos compostos do tipo viniferina. A produção fenólica total também apresenta um incremento significativo, relativamente ao controlo, quando as culturas de células são eliciadas com MeJ ou, nomeadamente, com *Pc* (figura 2).

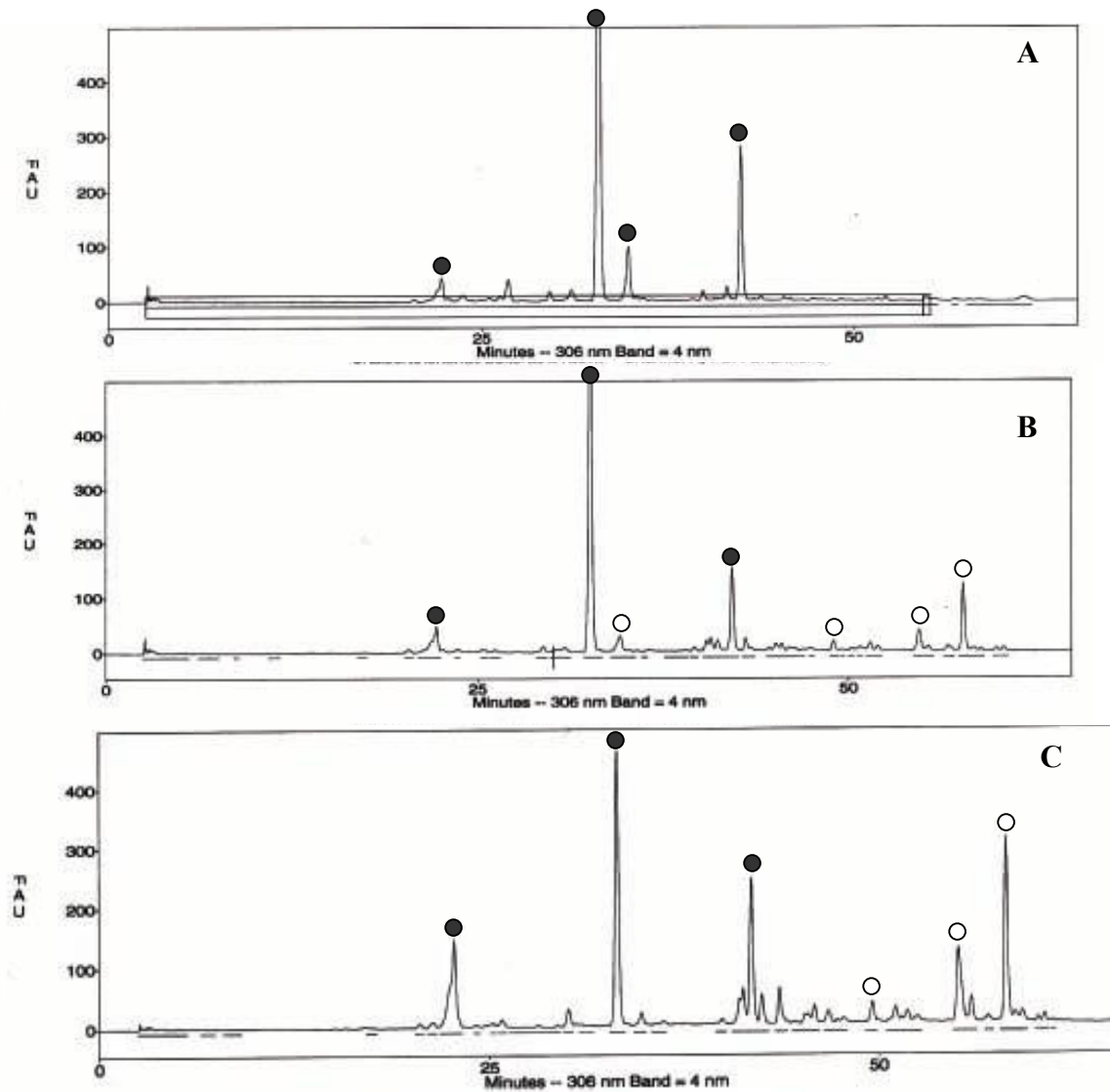


Figura 1 – Perfis cromatográficos de extractos fenólicos de culturas de *V. vinifera*, a 306nm. A – culturas controlo. B - culturas eliciadas com 30 mg de biomassa de fungo *Pc*. C - culturas eliciadas com MeJ (100μM). Compostos tipo piceido (●) e tipo viniferina (○).

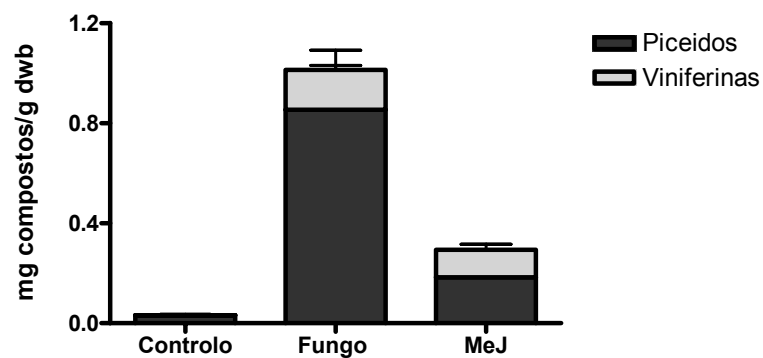


Figura 2 – Produção fenólica total de culturas de células de *V. vinifera*. Culturas controlo, culturas eliciadas com 30 mg de biomassa do fungo *Pc* (fungo) e culturas eliciadas com MeJ (100 μM).

Discussão

A eliciação de culturas de células de *Vv* com o fungo *Pc* induz mudanças na componente fenólica, havendo a produção de novos compostos do tipo viniferina. Estas substâncias poderão estar envolvidas na defesa da planta a este fungo, uma vez que este tipo de compostos tem sido descrito como tendo uma actividade antifúngica. Nomeadamente, foi descrito o aumento da produção *in vivo* de compostos deste tipo, em plantas que apresentavam sintomas de esca (Amalfitano, 2000).

A eliciação com MeJ provoca alterações na componente fenólica similares às provocadas pela eliciação com o fungo. Assim, é possível que esta molécula desempenhe um papel importante no mecanismo de resposta ao fungo, nomeadamente como molécula sinal.

Neste trabalho as culturas *in vitro* de *Vv* revelaram-se uma boa ferramenta no estudo das interacções planta/esca, uma vez que são fáceis de manipular e permitem a realização de ensaios no espaço de poucas semanas, em condições controladas.

Bibliografia

Amalfitano, C.; Evidente, A.; Surico, G.; Tegli, S.; Bertelli, E.; Mugnai, L.; 2000; Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines; *Phitopathol. Mediterr.*; 39:178-183

Graniti, A.; Surico, G. and Mugnai, L.; 2000; Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases?; *Phitopathol. Mediterr.*; 39:16-20

Larington, P. and Dubos, B.; 1997; Fungi associated with esca disease in grapevine; *European Journal of Plant Pathology*; 103:147-157

Mugnai, L.; Surico, G. and Esposito, A.; 1996; Microflora associata al mal dell'esca della vite in Toscana; *Informatore Fitopatologico*; 11:49-55

Mugnai, L.; Graniti, A. and Surico, G.; 1999; Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two old and Elusive Diseases of Grapevines; *Plant Disease*; 83:404-418