

# DOENÇAS DO LENHO – UMA REALIDADE NAS REGIÕES VITICOLAS NACIONAIS

Mafalda FELGUEIRAS<sup>1,3</sup> & Marta LIMA<sup>1,3</sup>; Gisela CHICAU<sup>4</sup>; José MOUTINHO-PEREIRA<sup>2,3</sup>; Alberto DIAS<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>UNIVERSIDADE DO MINHO, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, CAMPUS DE GUALTAR, 4710-057 BRAGA

<sup>2</sup>UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO, DEPARTAMENTO DE BIOLOGICA E AMBIENTAL, Apt. 1013, 5001-911 VILA REAL

<sup>3</sup>CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E DE TECNOLOGIAS AGRO-AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS (CITAB), Apt. 1013, 5001-911 VILA REAL

<sup>4</sup>DIVISAO DE PROTECÇÃO E CONTROLO FOTOSSANITÁRIO, LABORATÓRIO DE PROTECÇÃO DAS CULTURAS, ESTRADA EXTERIOR DA CIRCUNVALAÇÃO Nº 11846, 4460-281 SENHORA DA HORA

[\\*acpdias@bio.uminho.pt](mailto:acpdias@bio.uminho.pt)

## RESUMO

A viticultura mundial tem-se deparado com o aumento das doenças do lenho que têm afectado, sem discriminação, todas as regiões vitivinícolas mundiais. Sob esta designação, existem doenças que afectam essencialmente vinhas jovens: pé-negro, doença de Petri; bem como vinhas adultas, como é o caso da Esca. Nos últimos anos, o aumento da incidência da esca ganhou importância na Europa. Em 1999 estimava-se que o seu grau de incidência na área vitícola da Hungria, França, Alemanha e Itália era de 11, 15, 9 e 90 %, respectivamente. Desde então, não existem prospecções que assinalem uma diminuição da sua incidência nesses mesmos países. Por outro lado, surgem periodicamente relatos de novos casos de esca em diferentes regiões vitícolas mundiais, nomeadamente, nas regiões vitícolas portuguesas. Uma vasta gama de sintomas estão associados à esca, como também uma série de fungos são responsáveis pelo seu aparecimento. As consequências da manifestação da esca traduzem-se, em campo, por perda de vigor das videiras e diminuição da qualidade das uvas, mostos e vinhos. Nesse contexto, foi desenvolvido trabalho em campo e em laboratório para tentar averiguar: quais as alterações fisiológicas que a presença da doença provoca em plantas infectadas; que respostas bioquímicas as videiras desenvolvem em presença da doença; e se a aplicação de agentes de controlo biológico (BCAs) pode ajudar a minimizar os efeitos negativos da presença da esca. Plantas com esca revelam: ocorrência de diminuição acentuada da capacidade fotossintética e desencadeamento de reacções bioquímicas constitutivas de defesa; um efeito positivo da aplicação de BCAs. Também, um modelo de cultura *in vitro* (suspensões celulares) indica que as células de videira estão aptas a iniciar mecanismos de defesa quando na presença do fungo associado à esca *Phaeomoniella chlamydospora*.

Palavras-chave: doenças do lenho, Esca, agentes de controlo biológico, mecanismos de defesa.

## 1 – INTRODUÇÃO

A viticultura mundial tem-se deparado com um novo tipo de doenças – doenças do lenho – que têm afectado, sem discriminação, todas as regiões vitivinícolas mundiais. Sob esta designação, existem doenças que afectam essencialmente vinhas jovens: pé-negro, doença de Petri; bem como vinhas adultas, como é o caso da Esca (Mugnai *et al.*, 1999). Nos últimos anos, a esca reapareceu nas bacias do Mediterrâneo e no Norte e Sul da América, tendo aumentado a sua incidência e a severidade com que se manifesta (Surico, 2000). Na Hungria, França e Alemanha estima-se que a incidência da esca na área vitícola seja de 11, 15 e de 9%, respectivamente (Mugnai *et al.*, 1999). Em Itália a esca atinge todas as regiões vitícolas, em algumas delas afectando 90 a 100% dos vinhedos (Mugnai *et al.*, 1999). Desde então, não existem prospecções que assinalem uma diminuição da sua incidência nesses mesmos países. Por outro lado, surgem periodicamente relatos de novos casos de esca em diferentes regiões vitícolas mundiais, nomeadamente, nas regiões vitícolas portuguesas. No caso particular de Portugal são inúmeros os relatos da incidência actual da doença (Chicau *et al.*, 2000; Rego, *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Felgueiras, 2006; Santos *et al.*, 2006).

Uma vasta gama de sintomas estão associados à esca, como também uma série de fungos são responsáveis pelo seu aparecimento (Phillips, 1998). As consequências da manifestação da esca tem-se traduzido em quebras drásticas do pegamento à enxertia, atraso no desenvolvimento vegetativo e perda de vigor das videiras, depauperamento geral das vinhas (Felgueiras, 2006) e diminuição da qualidade das uvas, mostos e vinhos (Calzano *et al.*, 2004). O diagnóstico da esca, através dos métodos tradicionais, não é fácil nem célere, pela natureza dos fungos envolvidos e pela dificuldade em atribuir a responsabilidade inequívoca de determinada sintomatologia a um único agente causal (Oliveira *et al.*, 2003). A variabilidade de sintomas existentes levou a que fossem atribuídos diferentes nomes a esta síndrome como *black measles*, *Spanish measles*, *folletage*, esca, declínio das videiras e apoplexia (Phillips, 1998). As videiras afectadas com esca podem apresentar dois tipos

de evolução da doença: crónica ou repentina (apoplexia). De uma forma geral, a evolução crónica da doença manifesta-se pela redução progressiva na quantidade de vegetação (folhas e novos lançamentos), tornando as videiras menos produtivas e menos vigorosas ao fim de alguns anos (Phillips, 1998). Relativamente à evolução repentina da doença, esta manifesta-se normalmente durante o período quente e seco do ano (Verão), a seguir a chuvas abundantes e atinge preferencialmente cepas aparentemente sãs. Este tipo de manifestação violenta da doença leva à morte fulminante de sarmentos e braços inteiros, cujas folhas e cachos podem secar em poucas horas, ou em situações mais severas à morte de toda a planta.

Nesse contexto, foi desenvolvido trabalho em campo e em laboratório para tentar averiguar: quais as alterações fisiológicas que a presença da doença provoca em plantas infectadas; que respostas bioquímicas as videiras desenvolvem em presença da doença; e se a aplicação de agentes de controlo biológico (BCAs) pode ajudar a minimizar os efeitos negativos da presença da esca (Felgueiras, 2006; Lima, 2009). Os resultados revelam que plantas infectadas com esca apresentam diminuição acentuada da capacidade fotossintética e desencadeiam reacções bioquímicas constitutivas de defesa. Ensaio preliminares de aplicação de BCAs, em plantas envasadas, mostram um efeito positivo nos parâmetros fisiológicos de crescimento, consequência da aplicação dos mesmos. Também, em cultura *in vitro* (suspensões celulares) indica que as células de videira estão aptas a iniciar mecanismos de defesa quando na presença do fungo associado à esca – *Phaeomoniella chlamydospora*.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os ensaios de campo foram efectuados em folhas da casta Alvarinho (recolhidas de plantas situadas na Região Demarcada dos Vinhos Verdes (RDVV) no Verão de 2005) com e sem manifestação de sintomas externos de esca, e em videiras envasadas com um ano de idade. Para a avaliação do parâmetro fisiológico fotossíntese, foi utilizado um analisador de gás por radiação infravermelha – IRGA – funcionando em modo diferencial e em circuito aberto (*Analytical Development Co. Ltd. Mod. LCA-4*), o qual permitiu

avaliar *in vivo* o funcionamento do aparelho fotossintético das videiras objecto de estudo. De cada videira seleccionada foi escolhido um braço que apresentasse folhas com sintomas foliares de esca, no qual foram escolhidas para efectuar medições, folhas aparentemente sãs (FapB – sem manifestação de sintomas foliares de esca) e folhas doentes (FD – com sintomas foliares de esca). Na mesma videira, foram ainda escolhidas folhas sem sintomatologia foliar (FB) de outro braço principal que não apresentasse nenhuma folha com sintomatologia foliar de esca.

Para a realização dos ensaios bioquímicos, essas mesmas folhas foram liofilizadas e trituradas individualmente, para poderem ser analisadas. Os ensaios em laboratório foram realizados em culturas de suspensões celulares obtidas a partir de explantes foliares brotados de varas da casta Vinhão. Às suspensões celulares foi adicionado um extracto de biomassa liofilizada do fungo *P. chlamydospora* (isolado de videiras afectadas pela esca na RDVV) e a resposta das culturas em termos de produção fenólica (por HPLC), resposta oxidativa (através da sonda 2', 7' – diclorodihidrofluoresceína diacetato – H<sub>2</sub>DCF-DA) e expressão de genes relacionados com a defesa (por RT-PCR semi-quantitativo) foram avaliados. Relativamente aos ensaios com agentes de controlo biológico (BCAs), foi estabelecido, em 2007, 1 campo experimental com plantas da casta Alvarinho. Nove grupos de doze plantas foram estabelecidos para cada BCA a ser testado. Cada BCA foi aplicado cada quinze dias durante os meses de Julho e Agosto.

### **3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com o intuito de tentar estabelecer uma relação causa-efeito entre a manifestação dos sintomas foliares típicos da presença da esca em videiras (cv. Alvarinho) e possíveis alterações ao nível do seu sistema fotossintético, foram calculados em campo, valores instantâneos de taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> – A. Os resultados revelam que os valores de A experimentam uma diminuição significativa, em folhas afectadas pela esca (FapB, FD) (Quadro 1). Nas folhas doentes (FD) os valores de A apresentam-se extremamente baixos, tendo-se obtido para algumas folhas analisadas valores

muito próximos de zero. Nas folhas aparentemente sãs (FapB), os valores de A mostram-se significativamente inferiores aos obtidos para as folhas sãs (FB) e, em algumas das folhas analisadas obtiveram-se valores muito próximos dos obtidos em folhas doentes (FD), para uma mesma planta. De uma forma geral, verifica-se que A diminui abruptamente, quando passamos de folhas boas (FB), para folhas aparentemente sãs (FapB) e folhas visivelmente doentes (FD). Os resultados das médias globais dos valores de A mostram diferenças estatísticas extremamente significativas (Quadro 1), entre as três condições avaliadas e uma diminuição gradual da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), no sentido FB>FapB>FD.

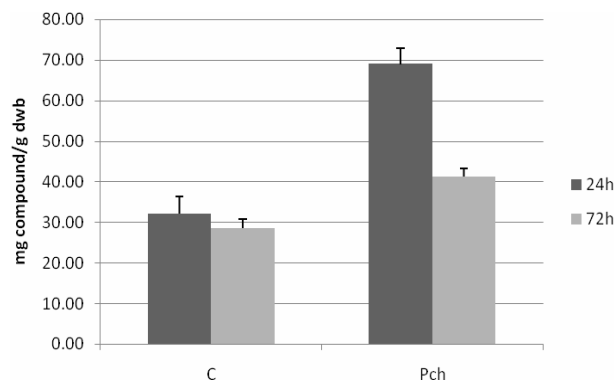
**Quadro 1** – Valores médios instantâneos de taxa fotossintética aparente (A; mmol<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Médias com letras comuns não são significantemente diferentes, a p≥0.05.

Condição	A (mmol <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
FB	10.72 ± 0.63 c
FapB	2.64 ± 0.28 b
FD	0.42 ± 0.09 a

A produção total de compostos fenólicos tipo stilbeno foi quantificada 24 e 72 horas após eliciação das culturas de células de *V. vinífera* cv. Vinhão com extracto do fungo *P. chlamydospora* (Figura 1). Os resultados indicam que, quando comparado com o controlo, a eliciação fúngica induz um aumento significativo (p<0,01) da produção stilbénica das culturas de células num curto período de tempo (24 horas). A produção de stilbenos decresce 72 horas após a eliciação com extracto do fungo, mas ainda permanece significativamente (p<0,01) mais alta do que nas culturas controlo.

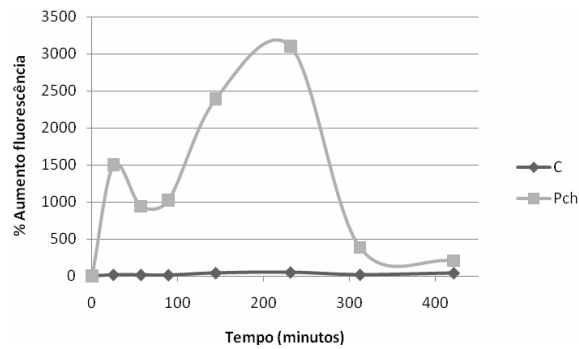
O aumento da produção fenólica nas culturas de células, nomeadamente stilbenos, após eliciação fúngica aponta para uma resposta de defesa por parte das células. A síntese de fitoalexinas fenólicas é um mecanismo de defesa reconhecido em plantas, nomeadamente em videiras. Em *Vitis* spp. estas

substâncias acumulam-se em resposta a eliciadores bióticos e abióticos, tais como irradiação ultra-violeta (Langcake *et al.*, 1977; Adrian *et al.*, 2000) e patogénicos bacterianos ou fúngicos como *Pseudomonas syringae* (Robert *et al.*, 2001), o agente causador da podridão cinzenta - *Botrytis cinerea* (Bavaresco *et al.*, 1997; Goetz *et al.*, 1999; Jeandet *et al.*, 1995), um dos agentes causadores da podridão do bago - *Rhizopus stolonifer* (Sarig *et al.*, 1997) e o causador do míldio - *Plasmopara viticola* (Dai *et al.*, 1995; Langcake *et al.*, 1997) . Assim, é possível que o aumento da produção fenólica do tipo stilbélico induzida nas células possa estar envolvida no mecanismo de defesa contra *P. chlamydospora*.



**Figura 1** – Produção fenólica total de culturas de células de *V. vinifera* cv. Vinhão. Culturas controlo e culturas eliciadas com 0,5 mg/ml de biomassa do fungo *P.chlamydospora* (*Pch*).

A cinética de acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em culturas de células de *V. vinifera* cv. Vinhão é apresentada na Figura 2. Eliciação com o extracto fúngico induz um *burst* oxidativo bifásico. Um *burst* rápido e pouco intenso surge cerca de 25 minutos após a eliciação. Um segundo *burst* mais intenso e mais longo atinge um máximo cerca de 230 minutos após a eliciação.



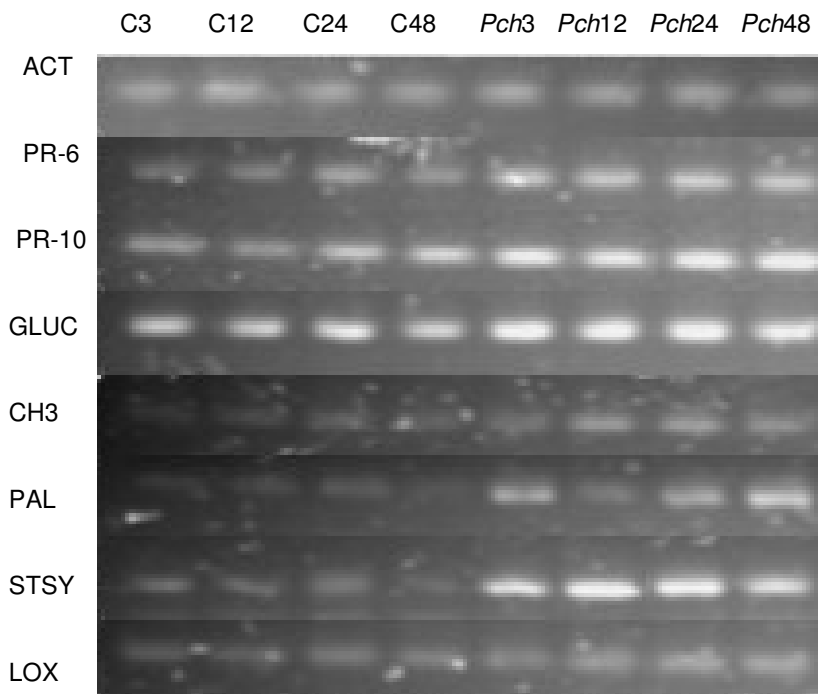
**Figura 2** – Níveis de ROS indicados pelo aumento de fluorescência (%) relativamente ao tempo 0 minutos (que corresponde à eliciação fúngica) em culturas de células de *V. vinifera* cv. Vinhão. C – Controlo; Pch – Extracto de *P. chlamydospora* (0.5mg/ml).

A resposta oxidativa registada nas suspensões celulares de *V. vinifera* eliciadas com o extracto do fungo *P. chlamydospora* tem um perfil típico de um *burst* oxidativo após infecção, que se caracteriza por um *burst* pequeno e rápido seguido de outro mais longo e intenso. A presença de uma resposta oxidativa no início de uma infecção foi descrita pela primeira vez quando tecido tubercular de batata foi inoculado com *Phytophthora infestans* (Doke *et al.*, 1983). O rápido aparecimento de ROS é considerado um dos eventos mais precoces produzidos por uma eliciação, nomeadamente um *burst* oxidativo bifásico (Lamb *et al.*, 1997). Geralmente, uma interacção compatível induz um único *burst* não específico, enquanto uma interacção incompatível gera uma resposta oxidativa bifásica, sendo a segunda fase do *burst* correlacionada com resistência à doença (Lamb *et al.*, 1997).

A expressão de sete genes relacionados com a defesa foi analisada em suspensões celulares de *V. vinifera* cv. Vinhão eliciadas com extracto do fungo *P. chlamydospora*. A expressão dos genes que codificam proteínas relacionadas com a patogénese (proteínas PR) e enzimas envolvidas nas vias octadecanóica e fenilpropanoide - PR classe 6 (PR-6), PR classe 10 (PR-10),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLUC), quitinase classe III (CH3), lipoxigenase (LOX), fenilalanina amónia liase (PAL) e stilbeno sintetase (STSY) – foi analisada por RT-PCR semi-quantitativo 3, 12, 24 e 48 horas após eliciação das culturas com

extracto fúngico. O padrão de acumulação de transcriptos de actina (ACT), PR-6, PR-10, GLUC, CH3, PAL, STSY e LOX é apresentado na Figura 3.

A acumulação de transcritos de ACT foi avaliada com o propósito de usar a ACT como gene de controlo no ensaio. Como a Figura 3 indica que a transcrição do gene da ACT não apresenta grandes diferenças ao longo do tempo e das condições experimentais, o gene da ACT foi considerado apto a ser um gene de controlo, tendo sido usado para normalizar a expressão dos genes em estudo em diferentes amostras. A expressão dos genes PR-6, PR-10, GLUC, CH3, PAL, STSY e LOX é claramente aumentada em resposta à eliciação fúngica.



**Figura 3** – Acumulação de transcritos de genes relacionados com a defesa, 3, 12, 24 e 48 horas após eliciação fúngica. C – Controlo; Pch – *P.chlamydospora* extracto (0.5mg/ml).

No geral, os resultados obtidos no laboratório indicam que as suspensões celulares de *V. vinifera* cv. Vinhão despoletam mecanismos de defesa em resposta à eliciação com extracto do fungo relacionado com a esca, *P. chlamydospora*, nomeadamente aumento da produção de compostos fenólicos,



indução de resposta oxidativa bifásica e activação da transcrição de vários genes comumente relacionados com respostas de defesa em plantas.

Relativamente aos resultados obtidos, para o primeiro ano de ensaio com BCAs, estes sugerem que a sua aplicação exerce um efeito positivo nos parâmetros de crescimento, bem como, na capacidade fotossintética das plantas. No que se refere aos parâmetros de crescimento os resultados apontam para um aumento do número total de folhas, como também um aumento do comprimento dos troncos e das raízes. Contudo, estes resultados serão comprovados com o decorrer do ensaio por mais dois anos.

**Nota Final:** As autoras Mafalda Felgueiras e Marta Lima contribuíram de forma equivalente para a realização desta comunicação. O trabalho de ambas foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia [M. Lima: SFRH/BD/17944/2004; M. Felgueiras: SFRHD/BD/32159/2006]

#### 4 – BIBLIOGRAFIA

- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil A-C, Tesson L, Bessis R. (2000) "Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6103-6105.
- Bavaresco, L.; Petegolli, D.; Cantu, E.; Fregoni, M.; Chiusa, G.; Trevisan, M. (1997) "Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexin in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*". *Vitis*; 36:77-83
- Chicau, G.; Aboim-Ingles, M.; Cabral, S.; Cabral, J. (2000) "*Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Phaeoacremonium angustius* with esca and grapevine decline in Vinho Verde grapevines in northwest Portugal". *Phytopathol. Mediterr.* 39:80-86.
- Dai, G.H.; Andary, C.; Mondolot-Cosson, L.; Boubals, D. (1995) "Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*". *Physiological and Molecular Plant Pathology*; 46:177-188
- Doke N. (1983) "Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components". *Physiology and Plant Pathology* 23: 345-357.
- Douillet-Breuil A-C, Jeandet P, Adrian M, Bessis R. (1999) "Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4456-4461.
- Felgueiras M. (2006) *Estudo da Interação Vitis vinifera cv. Alvarinho-Esca: isolamento e identificação de fungos responsáveis pela doença e avaliação*

- de alterações bioquímicas em plantas infectadas*. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal.
- Goetz G, Fkyerat A, Métais N, Kunz M, Tabacchi R, Pezet R, Pont V. (1999) "Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase". *Phytochemistry* 52: 759-767.
- Jeandet P, Bessis R, Sbagghi M, Meunier P. (1995) "Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions". *Journal of Phytopathology* 143: 135-139.
- Lamb, C.; Dixon, R.A. (1997) "The oxidative burst in plant disease resistance". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 48:251-275
- Langcake P, Pryce R. (1977) "The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation". *Phytochemistry* 16: 1193-1196.
- Lima, M. (2009) *Contributions to the study of Vitis vinifera defence mechanisms against esca*. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Portugal.
- Mugnai, L.; Graniti, A.; Surico, G. (1999) "Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: two old and elusive diseases of grapevines". *Plant Disease*. 83(5):404-418.
- Oliveira, H.; Rego, C.; Nascimento, T. (2003) Doenças do lenho da videira: uma ameaça à produção estável em viticultura. In *Actas da Associação Portuguesa de Horticultura*. Torres Vedras. 2:96-111.
- Phillips, A. Z. I. (1998) Esca and escoriose of grapevine: a different approach and different pathogen. *Actas 2ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. 98:76-81.
- Calzarano, F.; Seghetti, L.; Del Carlo, M.; Cichelli, A. (2004) "Effect of esca on the quality of berries, musts and wines". *Phytopathologia Mediterranea*. 43:125-135.
- Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H. (2001) Estudo sobre os fungos *Cylindrocarpon destructans* e *Phaeoconiella chlamydospora* em materiais vitícolas. 5º Simpósio de Viticultura de Alentejo. Évora-Portugal. 1:27-35.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thévenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R. (2001) "Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pti*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein". *European Journal of Plant Pathology* 107: 249-261.
- Santos, C.; Fragoeiro, S.; Phillips, A. (2005) "Physiological response of grapevine cultivars and rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses". *Scientia Horticulturae* 103(2):187-198.
- Santos, C.; Fragoeiro, S.; Valentim, H.; Phillips, A. (2006) "Phenotypic characterization of *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* strains isolated from grapevine: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses". *Scientia Horticulturae*. 107:123-130.
- Sarig P, Zutkhi Y, Monjauze A, Lisker N, Ben-Arie R. (1997) "Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*". *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 337-347.
- Surico, G. (2000) "The grapevine and wine production through the ages". *Phytopatol. Mediterr.* 39:3-10.