

# PRODUÇÃO DIFERENCIAL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM CAULES DE *PINUS PINASTER* INOCULADOS COM O NEMÁTODO DA MADEIRA DO PINHEIRO (*BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*)

## Producción diferencial de compuestos volátiles en tallos de *Pinus pinaster* inoculados con el nemátodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*)

Marta R. M. Lima, António C. Silva Ferreira e Marta W. Vasconcelos

CBQF-Centro de Biotecnologia e Química Fina. Escola Superior de Biotecnologia. Centro Regional da Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida. 4200-072-PORTO (Portugal). Correo electrónico: mvasconcelos@porto.ucp.pt

### Resumo

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é o principal agente causal da doença da murchidão do pinheiro. Esta é uma enfermidade grave que afecta florestas de coníferas com uma elevada taxa de mortalidade. Presentemente não são conhecidos meios eficazes de combate à doença da murchidão do pinheiro, apesar da enfermidade ser conhecida e ser alvo de investigação há várias décadas. A complexidade desta doença, na qual vários mecanismos de patogénese parecem agir em simultâneo, contribui em grande parte para a inexistência de um tratamento eficaz, pelo que o aprofundamento do conhecimento da doença é fundamental. Neste trabalho usou-se SPME-GC/MS para estudar a modificação na composição de compostos de natureza volátil em caules de *Pinus pinaster* após inoculação com NMP. A componente volátil de caules inoculados mostrou ser significativamente diferente da de caules controlo. Uma análise estatística multivariada de componentes principais (PCA) demonstrou uma completa separação dos 2 grupos.

Palavras-chave: NMP, Doença da murchidão do pinheiro, Componente volátil, Headspace SPME-GC/MS, PCA

### Resumen

El nematodo de la madera del pino (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, es el principal agente causal de la enfermedad del marchitamiento del pino. La enfermedad es grave y afecta a los bosques de coníferas con una tasa de mortalidad elevada. En la actualidad no se conocen medios eficaces para combatirla, a pesar de que se está investigando y de que es conocida desde hace varias décadas. La complejidad de esta enfermedad, en la que varios mecanismos de patogénesis parecen actuar simultáneamente contribuye en gran medida a la falta de un tratamiento eficaz, de modo que una comprensión más profunda de la enfermedad es necesaria. En este trabajo, la técnica SPME-GC/MS se utilizó para estudiar la modificación de la composición de compuestos volátiles derivados de *Pinus pinaster* tras de la inoculación con NMP. Los componentes volátiles de los tallos inoculados fueron signi-

ficativamente diferentes de los tallos de control. Un análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA) mostró una completa separación de los dos grupos.

Palabras clave: NMP, Enfermedad del marchitamiento del pino, Componente volátil, Headspace SPME-GC/MS, ACP

## INTRODUÇÃO

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é o principal agente causal da doença da marchidão do pinheiro. Sendo considerado originário da América do Norte, o NMP propagou-se para a Ásia no início do século passado e, mais tarde, para a Europa, sendo previsível que venha a afectar a região do Mediterrâneo e regiões secas do continente europeu (MOTA et al., 1999; VIEIRA et al., 2007). O primeiro registo do NMP em território europeu deu-se em 1999 em Portugal, na Península de Setúbal, tendo sido estabelecida uma zona de quarentena de modo a restringir a disseminação do NMP na União Europeia. A presença do nemátode também alertou as autoridades para um controlo mais apertado nas trocas comerciais de produtos que envolvam madeira, uma vez que as trocas comerciais parecem ser o factor disseminador mais importante do NMP. Paralelamente, levou a um investimento em programas para investigar a doença do nemátode da madeira do pinheiro por parte da União Europeia e de governos individuais (MOTA & VIEIRA, 2008). No entanto, apesar das medidas específicas implementadas para conter a doença, não foi possível evitar a dispersão do nemátode por todo o território português. Actualmente, a presença do NMP é reconhecida também em Espanha (ABELLEIRA et al., 2011; DXPA, 2010; Eppo, 2009).

O NMP é disseminado por um insecto vector do género *Monochamus*, em particular em Portugal pelo *M. galloprovincialis*, que transmite o nemátode através das feridas de alimentação. Dado a preferência deste insecto por *P. pinaster* como local de maturação e alimentação, esta espécie é particularmente afectada tendo-se revelado um hospedeiro susceptível ao NMP (MOTA & VIEIRA, 2008). O desenvolvimento da doença parece ocorrer em pelo menos 2 fases: precoce e tardia. Durante a fase precoce, não são visíveis sintomas externos, mas o movimento de alguns

nemátodes no caule (do canal resinífero do córtex para o canal resinífero xilémico) induz sintomas internos que se traduzem em modificações citológicas (desnaturação e necrose) nos parênquimas xilémicos radial e axial, que dão origem a síntese de terpenos, cavitação e embolismo dos traqueídeos. Nesta fase, não há aumento da população de nemátodes e o estado fisiológico das folhas mantém-se normal (FUKUDA, 1997). Na fase tardia, a população de nemátodes multiplica-se rapidamente e os sintomas progridem velozmente com o aparecimento de sintomas externos e culminando na morte da planta. Normalmente, esta fase só se manifesta em plantas susceptíveis infectadas com nemátodes virulentos. Nesta fase, o aumento da produção de etileno no caule acompanha a morte das células do câmbio e leva ao aparecimento embolismos no xilema externo; estes resultam na diminuição do potencial hídrico das folhas e na paragem da fotossíntese (FUKUDA, 1997).

Apesar de décadas de investigação sobre a doença da marchidão do pinheiro, o mecanismo de patogénese ainda não foi claramente elucidado, pensando-se que vários mecanismos podem agir em simultâneo para provocar a morte das árvores, nomeadamente a acção de celulasas, fitotoxinas e terpenoides produzidas pelo NMP, pela flora bacteriana associada ao nemátode ou pelo hospedeiro (WANG et al., 2010). Presentemente não são conhecidos meios eficazes de combate à doença da marchidão do pinheiro, o que em muito se deve à sua natureza complexa pois resulta da interrelação entre 3 agentes principais, escaravelho vector, hospedeiro e NMP, bem como da presença de determinados fungos no hospedeiro e das bactérias associadas ao NMP. O aprofundamento do conhecimento da doença torna-se assim fundamental para encontrar meios eficazes de combate à doença. Neste trabalho apresentam-se resultados preliminares sobre o estudo da componente volátil de caules de *P. pinaster* após inoculação com NMP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura de nemátodes

*B. xylophilus* virulento (BxHF) foi cultivado durante 1 semana em *Botrytis cinerea* (crescido durante 7 dias em 5 ml de grãos de cevada autoclavados). Os nemátodes foram extraídos usando a técnica do funil de Baermann (BAERMANN, 1917), foram contados com a ajuda de uma lupa, sendo depois preparada uma solução de 10 nemátodes/ $\mu$ l em água desionizada estéril.

### Inoculação e amostragem

5 árvores *P. pinaster* com 1 ano de idade (~25 cm de altura) foram inoculadas usando o método de ASAI & FUTAI (2001) com ligeiras modificações. Aproximadamente 4 cm abaixo da ponta da árvore fez-se um corte longitudinal, ao longo da casca, com cerca de 2 cm. Colocou-se papel absorvente e inoculou-se a ferida com 300 nemátodes em solução (5 árvores controlo foram inoculadas com água estéril) selando-se a zona com *Parafilme*<sup>®</sup> M. Os pinheiros foram mantidos em condições controladas com fotoperíodo e temperatura de 16 h luz 25°C/8 h escuro 20°C, com 80% de humidade relativa. A densidade de fluxo de fotões no período diurno foi 310  $\mu$ mol·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup>, fornecida por uma mistura de lâmpadas incandescentes e fluorescentes (Osram). Sete dias após a inoculação, os caules foram recolhidos, eliminando-se as raízes e as folhas, e congelados imediatamente em azoto líquido.

### Análise

Os caules foram macerados individualmente num almofariz, na presença de azoto líquido, mantendo-se as amostras a -80°C até preparação dos extractos. Prepararam-se extractos aquosos em água ultrapura (0,1 mg biomassa·ml<sup>-1</sup>), colocando-se 5 ml de extracto em *vials* de 20 ml. A preparação e armazenamento dos extractos foram feitos a 4°C, sendo estes analisados por GC/MS num espaço de 4 dias desde a preparação. Imediatamente antes da análise adicionou-se aos extractos 5  $\mu$ l 3-octanol 50,7 mg·l<sup>-1</sup> como padrão interno e um pequeno magneto, colocando-se depois o vial num banho a 40°C com agitação, e extraíndo-se o *headspace* por micro extração em fase sólida (SPME) durante 5 min. Usou-se uma fibra *divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane* (DVB/CAR/PDMS), 50/30 mm (Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.). Após 5 min de exposição ao *headspace*, a fibra foi recolhida e inserida no cromatógrafo gasoso durante 10 min, ocorrendo a desorção térmica dos compostos a 250°C, e sendo transferidos directamente para a coluna. A análise foi feita num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (Walnut Crick, Calif., U.S.A.) equipado com um detector de massa Varian Saturn 2000 e *software* Saturn GC/MS workstation versão 5.51. Usou-se uma coluna CP-Wax 58 FFAP CB (50 m, 0,25 mm, 0,20  $\mu$ m; ref CP 7727, Agilent Technologies). Temperatura do injector 220°C. O forno foi programado em modo gradiente de temperaturas, 40°C durante 1 min, aumentando depois 2°C·min<sup>-1</sup> até 220°C. O gás de arraste foi Hélio C-60 (Gasin, Portugal) com caudal constante a 1 ml·min<sup>-1</sup>. Outras especificações da análise foram previamente descritas (SILVA FERREIRA et al., 2003). As identificações foram feitas por comparação com injeção de padrões puros e combinada com NIST05.

*xane* (DVB/CAR/PDMS), 50/30 mm (Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.). Após 5 min de exposição ao *headspace*, a fibra foi recolhida e inserida no cromatógrafo gasoso durante 10 min, ocorrendo a desorção térmica dos compostos a 250°C, e sendo transferidos directamente para a coluna. A análise foi feita num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (Walnut Crick, Calif., U.S.A.) equipado com um detector de massa Varian Saturn 2000 e *software* Saturn GC/MS workstation versão 5.51. Usou-se uma coluna CP-Wax 58 FFAP CB (50 m, 0,25 mm, 0,20  $\mu$ m; ref CP 7727, Agilent Technologies). Temperatura do injector 220°C. O forno foi programado em modo gradiente de temperaturas, 40°C durante 1 min, aumentando depois 2°C·min<sup>-1</sup> até 220°C. O gás de arraste foi Hélio C-60 (Gasin, Portugal) com caudal constante a 1 ml·min<sup>-1</sup>. Outras especificações da análise foram previamente descritas (SILVA FERREIRA et al., 2003). As identificações foram feitas por comparação com injeção de padrões puros e combinada com NIST05.

### Tratamento estatístico

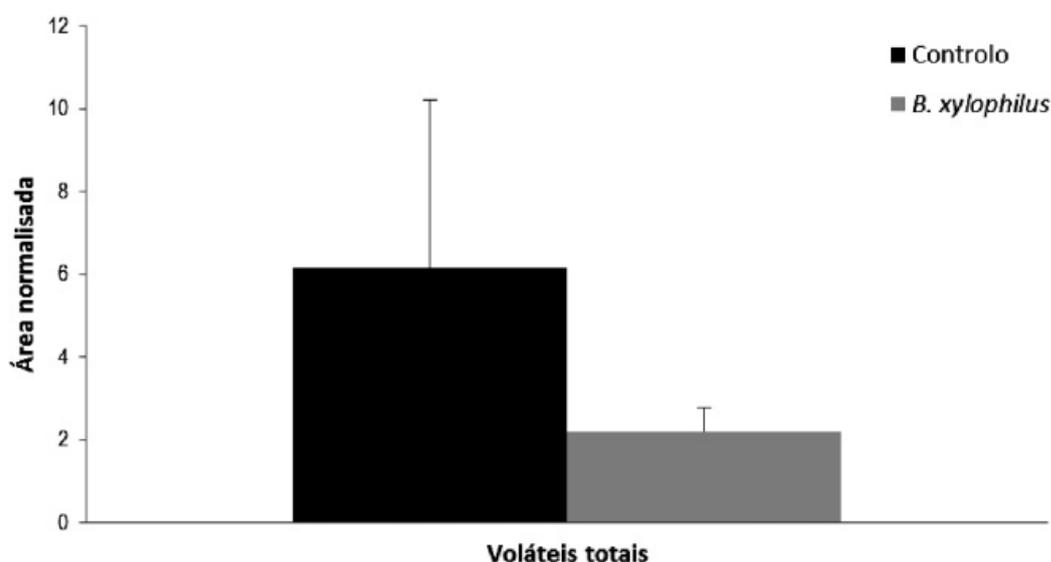
Foram calculadas médias e desvios-padrão da componente volátil total, e de cada um dos compostos detectados individualmente. Tendo em conta o pequeno tamanho amostral, usou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para investigar a existência de diferenças significativas entre caules inoculados e controlo. Foi considerada significância estatística para p<0,05. Os resultados foram também avaliados por análise estatística multivariada usando análise de componentes principais (PCA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

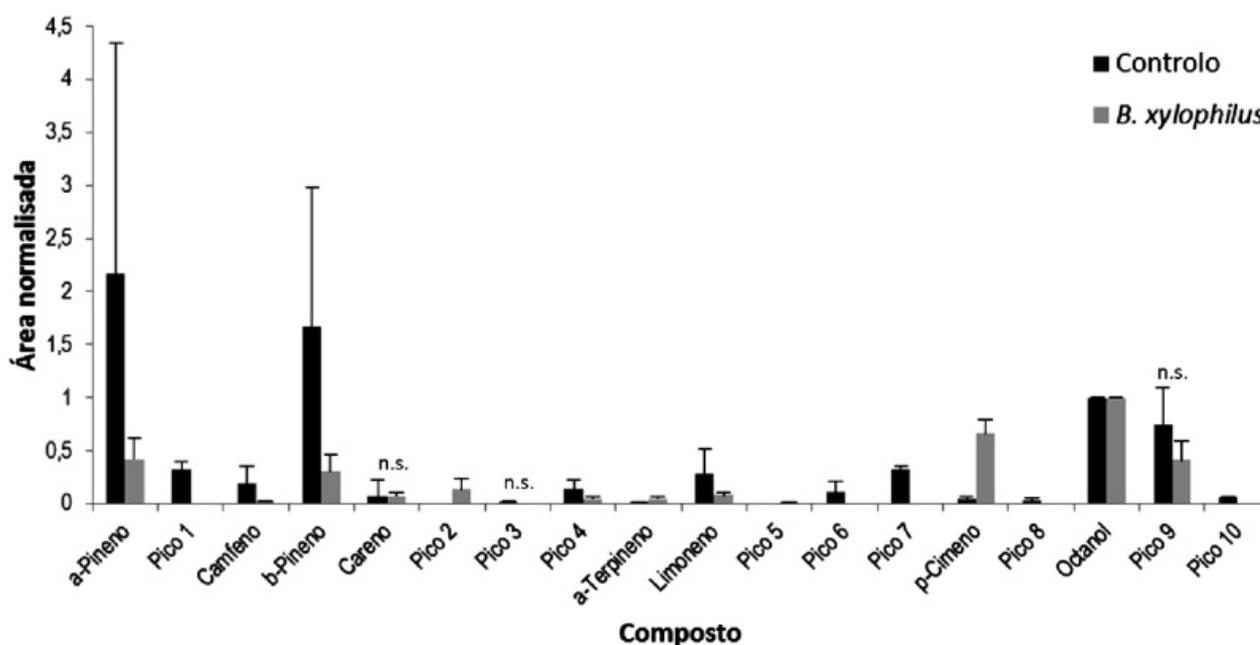
A produção de compostos químicos pelas plantas em resposta a uma infecção é um mecanismo largamente conhecido. Tal mecanismo foi também identificado em árvores do género *Pinus* em resposta à infecção (natural ou artificial) com NMP, admitindo-se que a produção de determinados compostos estão relacionados com resistência à doença da murchidão do pinheiro, pois não só foi confirmada uma produção diferencial entre espécies com diferentes graus de susceptibilidade, como também se verificou que esses compos-

tos seriam nematicidas ou inibidores da actividade dos nemátodes (FUTAI, 2003; HANAWA et al., 2001; YAMADA & ITO, 1993). Particularmente, a produção de compostos terpenoides voláteis poderá influenciar a doença em múltiplos níveis, uma vez que estes compostos podem exercer acção a nível da defesa do hospedeiro, no mecanismo de patogénese provocando cavitação, e a

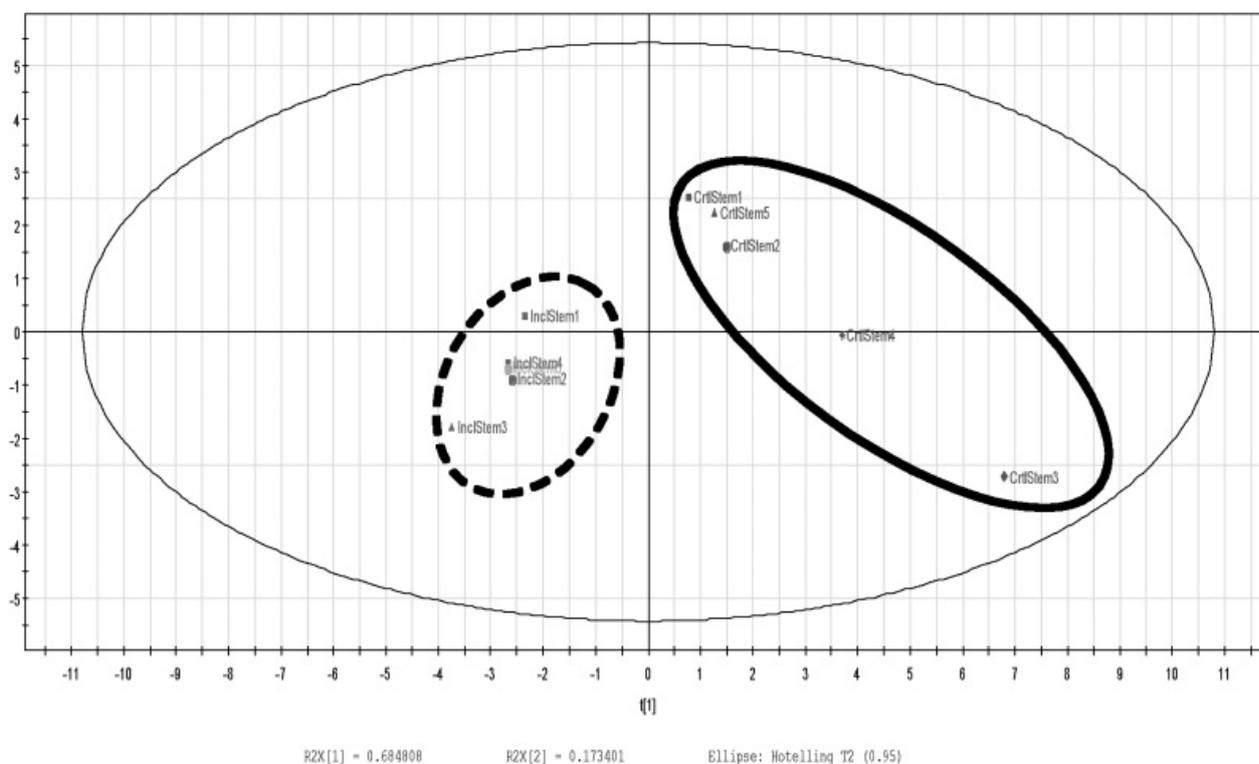
nível da atractividade dos escaravelhos vectores contribuindo para a propagação da doença. Tal acção é complexa e não completamente compreendida, uma vez que não envolve apenas aumento ou diminuição da produção de determinados terpenoides, mas o rácio entre eles (KURODA, 1989; KURODA, 1991; KURODA et al., 1991; TAKEUCHI et al., 2006; ZHAO et al., 2007).



**Figura 1.** Componente volátil total de caules de *Pinus pinaster* controlo e 7 dias após a inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus* (média +/- desvio padrão). A diferença é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )



**Figura 2.** Componentes da fracção volátil de caules de *Pinus pinaster* controlo e 7 dias após a inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus* (média +/- desvio padrão). Todas as diferenças são significativas ( $p < 0,05$ ) excepto os compostos identificados com n.s. (não significativo). Octanol foi usado como padrão interno



**Figura 3.** Análise de componentes principais mostrando completa separação de caules de *Pinus pinaster* controle (círculo linha cheia) e caules 7 dias após inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus* (círculo linha tracejada)

Os resultados preliminares por nós reunidos, demonstraram que a componente volátil de caules inoculados é diferente da de caules controle. Em termos totais a produção volátil de caules inoculados é significativamente menor (Figura 1), verificando-se uma produção diferencial de voláteis, com alguns compostos a serem produzidos *de novo* ou em maior quantidade nos caules inoculados; cerca de metade dos compostos detectados por GC/MS já foram identificados (Figura 2). A análise de componentes principais demonstrou uma completa separação dos 2 grupos (Figura 3), indicando que a inoculação com NMP induz modificações significativas na componente volátil dos pinheiros. Previamente, foi registado um aumento na componente volátil total em pinheiros resistentes/tolerantes (*P. taeda*/*P. strobus*) 1 semana após inoculação com NMP (KURODA et al., 1991). Assim, é possível que a diminuição da componente volátil total verificada em *P. pinaster* 1 semana após inoculação com o nemátode seja reflexo da sua susceptibilidade à doença. Para melhor compreender este fenómeno temos já em curso uma análise com um maior tamanho amostral e ao longo do tempo após inoculação com NMP.

### Agradecimentos

Ao Dr. Manuel Mota (Universidade de Évora, Portugal) pela cedência do isolado de *B. xylophilus*. Ao Fundo Florestal Permanente, Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas I.P. e Autoridade Florestal Nacional pelo financiamento.

### REFERÊNCIAS

- ABELLEIRA, A.; PICOAGA, A.; MANSILLA, J. P. & AGUIN, O.; 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, Causal Agent of Pine Wilt Disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Dis.* 95: 776-776.
- ASAI, E. & FUTAI, K.; 2001. Retardation of Pine Wilt Disease Symptom Development in Japanese Black Pine Seedlings Exposed to Simulated Acid Rain and Inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Forest Res.* 6: 297-302.
- BAERMANN, G.; 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum* (nema-

- toden) Larven in Erdproben. *Geneesk Tijdschr Ned-Indie* 57:131-137.
- DIRECCIÓN XERAL DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA; 2010. Resolución do 17 de novembro de 2010, da Dirección Xeral de Producción Agropecuaria, pola que se declara no territorio da Comunidade Autónoma de Galicia a presenza do organismo de corentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle et al. (nematodo do piñeiro) e se ordena comezar as medidas para a súa erradicación. *DOG* 228: 19633-19634 (de 26 de novembro).
- EPPO; 2009. PM 7/4(2): *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin* 39: 344-353.
- FUKUDA, K.; 1997. Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J. Forest Res.* 2: 171-181.
- FUTAI, K.; 2003. Abnormal metabolites in pine wood nematode-inoculated Japanese black pine. *Jap. J. Nematology* 33: 45-55.
- HANAWA, F.; YAMADA, T. & NAKASHIMA, T.; 2001. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57: 223-228.
- KURODA, K.; 1989. Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infected by the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 170-178.
- KURODA, K.; 1991. Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. *Eur. J. Forest Pathol.* 21: 82-89.
- KURODA, K.; YAMADA, T. & ITO, S.; 1991. *Bursaphelenchus xylophilus* induced pine wilt: factors associated with resistance. *Eur. J. Forest Pathol.* 21: 430-438.
- MOTA, M.; BRAASCH, H.; BRAVO, M.; PENAS, A.; BURGERMEISTER, W.; METGE, K. & SOUSA, E.; 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1: 727-734.
- MOTA, M. & VIEIRA, P.; 2008. Pine wilt disease in Portugal. In: B. Zhao, K. Futai, J. Sutherland & Y. Takeuchi (eds.), *Pine Wilt Disease*: 33-38. Springer. Japan.
- SILVA FERREIRA, A C. & GUEDES DE PINHO, P.; 2003. Analytical method for the determination of some aroma compounds on white wines by Solid Phase MicroExtraction and gas chromatography. *J. Food Sci.* 68: 2817-2820.
- TAKEUCHI, Y.; KANZAKI, N. & FUTAI, K.; 2006. Volatile compounds in pine stands suffering from pine wilt disease: qualitative and quantitative evaluation. *Nematology* 8: 869-879.
- VIEIRA, P.; BURGERMEISTER, W.; MOTA, M.; METGE, K. & SILVA, G.; 2007. Lack of genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses. *J. Nematology* 39: 118-126.
- WANG, Z.; WANG, C.; FANG, Z.; ZHANG, D.; LIU, L.; LEE, M.; LI, Z.; LI, J. & SUNG, C.; 2010. Advances in research of pathogenic mechanism of pine wilt disease. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 437-442.
- YAMADA, T. & ITO, S.; 1993. Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59: 666-672.
- ZHAO, L.; WEI, W.; KANG, L. & SUN, J.; 2007. Chemotaxis of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to volatiles associated with host pine, *Pinus massoniana*, and its vector *Monochamus alternatus*. *J. Chem. Ecol.* 33: 1207-1216.