

Identificação dos Metabólitos Orgânicos Voláteis (MOVs) em diferentes acessos do BAGcana e o seu papel na resistência a *Diatraea saccharalis*

Natalia Tavares Santos Ferreira¹, Demétrios José de Albuquerque Oliveira², Antonio Euzébio Goulart Santana³, Alessandro Riffel⁴

Resumo - O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma produção aproximada de 634 milhões de toneladas para a safra 2017/2018. Um importante fator restritivo para a expressão do potencial dessa cultura no Brasil é o ataque de pragas e doenças, e estima-se que cerca de 10% das perdas anuais para sejam ocasionadas por insetos, sendo a praga mais importante a broca da cana (*Diatraea saccharalis*). As plantas, durante seu processo evolutivo, para reduzir os danos causados pelo ataque dos insetos herbívoros, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles: barreiras físicas, metabólitos secundários tóxicos e a emissão de metabólitos orgânicos voláteis (MOVs) sinalizadores. Quando a planta é atacada por insetos herbívoros, ela emite MOVs que podem atrair inimigos naturais dos insetos, repelir a praga ou sinalizar a outras partes da planta e plantas vizinhas para o preparo da defesa. A manipulação da produção de metabólitos secundários tóxicos também tem sido utilizada na busca de alternativas para o controle de pragas e promoção de resistência. Os mecanismos de defesa apresentam-se tão distintos, que há variação dentro da espécie, fruto das diferenças de pressão de seleção durante o curso evolutivo. No entanto, pouco dessa variabilidade natural tem sido explorada para aplicação na agricultura. A prospecção da variabilidade natural entre parentais selvagens, rústicos ou até mesmo entre diferentes cultivares, pode ser uma ferramenta bastante útil no desenvolvimento de cultivares resistentes. Estudos envolvendo mecanismos de defesa e o conhecimento da variabilidade natural para a resistência a insetos ainda são bastante escassos. Nosso grupo de pesquisa vem desvendando os mecanismos de defesa da cana-de-açúcar e o presente trabalho teve como objetivo realizar análise do metaboloma da cana-de-açúcar no sítio de entrada da broca-da-cana e a caracterização da resistência em diferentes genótipos do complexo Saccharum, em busca de novas fontes de resistência.

Introdução

As plantas, durante seu processo evolutivo, na tentativa de reduzir os danos causados pelo ataque dos insetos herbívoros, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles: barreiras físicas, metabólitos secundários tóxicos e a emissão de metabólitos orgânicos voláteis (MOVs). Os MOVs podem atrair inimigos naturais, repelir a praga ou sinalizar diferentes partes da planta, desde a parte aérea até as raízes, como também plantas vizinhas para o preparo da defesa (Voelckel; Baldwin 2004; Agrawal, 1999; Dudareva et al., 2006; Dicke e Loreto, 2010; Dudareva et al., 2006; Baetz; Martinoia, 2014; Nalam; Nachappa, 2014). Os MOVs podem afetar diretamente a fisiologia e o comportamento dos herbívoros apresentando-se como tóxicos (antibiose) ou repelentes/deterrentes (antixenose) (Kessler; Baldwin, 2002).

A resistência de plantas é uma das formas mais efetivas para o controle de pragas e uma interessante alternativa ao uso de inseticidas. Para o desenvolvimento de variedades resistentes, é essencial identificar, caracterizar e categorizar as possíveis fontes dessa resistência. Na natureza, pragas com efeitos altamente devastadores raramente ocorrem, apesar da presença constante e abundante de insetos herbívoros. Isto ocorre devido à grande variedade de mecanismos de defesa que as plantas apresentam (Shoornhoven, 2005).

No entanto, estudos envolvendo mecanismos de defesa e o conhecimento da variabilidade natural para a resistência a insetos em cana-de-açúcar ainda são bastante escassos. Portanto, é importante desvendar os fundamentos e mecanismos dessa variação existente. Tais análises podem facilitar o desenvolvimento de marcadores moleculares para introduzir características de resistência em programas de melhoramento genético de culturas de importância econômica (Bergelson; Roux, 2010).

¹Graduanda em Engenharia Agrônoma, Maceió, AL.

²Químico da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL.

³Farmacêutico, professor e pesquisador da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL.

⁴Farmacêutico, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio-Largo), Rio Largo, AL.

Nos últimos anos, a Embrapa iniciou a implantação de seu Banco de Germoplasma do Complexo Saccharum (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *Erianthus* sp. e *Miscanthus* sp.) necessitando de uma caracterização para resistência a pragas. O ataque de pragas continua com o um dos fatores restritivos para aumentos de produtividade, e a variabilidade genética presente pode ser uma valiosa fonte para o desenvolvimento de materiais resistentes. Portanto, o presente projeto, dentro da variabilidade existente e ainda pouco caracterizada buscou identificar novas fontes de resistência, direta e indireta, para a cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Primeiramente foi realizada a análise do metaboloma do material vegetal restrito ao sítio de injúria pela lagarta para identificar possíveis metabólitos de defesa rápida na variedade SP 791011. Em seguida foram realizados os ensaios para verificar a atividade de antibiose entre os diferentes acessos do banco, como um *screening* inicial para selecionar e reduzir o número de acessos a serem caracterizados quimicamente. Na próxima etapa, com os materiais selecionados, serão realizados os ensaios de metabolômica e análise dos MOVs para identificar possíveis marcadores e novas fontes de resistência.

Material Vegetal

O material vegetal utilizado em todos os experimentos com cana de açúcar é oriundo do Banco de Germoplasma da Embrapa, sendo utilizados cinco diferentes genótipos. Os toletes foram plantados através de propagação de entrenós, cultivadas em copos plásticos de 0,5 L utilizando como substrato composto orgânico. As plantas de canas-de-açúcar desenvolveram-se em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade controladas, onde receberam os devidos tratos culturais. Na base dos copos plásticos foram abertos orifícios para o escoamento de possível excesso de água. Para o ensaio de metabolômica foi utilizada a cultivar SP791011. Para os ensaios de antibiose utilizaram-se os acessos: *Miscanthus* sp.Fiji 10, *Saccharum* híbrido US 67-22-2, *S. spontaneum* US72_1319, *Erianthus arundinaceus* Ij76-358, *Erianthus arundinaceus* IJ76-381

Obtenção e Manutenção da *Diatraea saccharalis*

Os insetos foram adquiridos junto a Usina Santo Antônio, s/n, zona rural, São Luís do Quitunde, AL. Para os experimentos sem chance de escolha foram utilizadas lagartas de terceiro instar. As lagartas foram mantidas em tubos de vidro com dieta artificial até quatro horas antes do início do experimento. A partir de então as lagartas foram privadas da alimentação tendo contato somente com algodão umedecido em água destilada. A privação de alimentação foi utilizada para garantir que as lagartas brocassem a cana durante os experimentos.

Bioensaios

A fim de avaliar a resistência do tipo antibiose, a performance larval das lagartas foi avaliada pela realização de um bioensaio sem chance de escolha de alimentação. O bioensaio foi realizado adicionando-se as lagartas na base da planta e deixando-a brocar por um período de 14 dias. Para o estudo do metaboloma utilizou-se o tempo de 120 horas. Após esse período, as lagartas foram cuidadosamente removidas do interior do colmo com auxílio de uma pinça. A performance larval foi calculada como a percentagem de ganho de peso antes e após sua alimentação nas plantas. Para manter a lagarta na base do colmo da planta, utilizou-se uma adaptação de gaiola telada. Cada tratamento foi composto por dez plantas (repetições) e uma lagarta por planta. A análise estatística dos valores para o ganho de peso foi realizada pelos testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

Extração de compostos para a análise metabolômica

Para a análise dos metabólitos coletou-se 10 amostras de folhas de plantas de cana-de-açúcar aos de cada acesso com 60 dias de idade. O procedimento para RMN 2D será o mesmo, porém foi analisada uma amostra de cada tratamento. As folhas foram seccionadas junto ao caule das plantas e imediatamente congeladas em N₂ líquido, armazenadas em temperatura de -80 °C. As amostras foram trituradas em N₂ líquido, secadas e então submetidas a extração. Para a extração pesou-se 50 mg de cada amostra em tubos de 1,5mL (tipo eppendorf) devidamente identificados, onde foi adicionado 500 µL de tampão fosfato (90 mmol/L, pH 6,0), o qual foi preparado adicionando 1,232 g de KH₂PO₄ e 10 mg de TSP (0,01%) para 100 mL de D₂O e posteriormente 500 µL metanol deuterado. Procedeu-se com a extração por microondas durante 30 minutos e centrifugação a 14000 RPM durante 15 minutos para a remoção dos resíduos sólidos. Posteriormente coletou-se o sobrenadante e procedeu-se com a análise por RMN em tubo adequado para este procedimento.

Análise por RMN e estatística multivariada

A identificação dos metabólitos não voláteis será feita com uso da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) RMN- ^1H , os espectros foram obtidos a 25 °C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio. Cada espectro de RMN- ^1H consistiu de 128 pulsos (10min e 26s) com tempo de aquisição de 5 s, largura do pulso de $90^\circ = 9,75 \mu\text{s}$, atraso (delay) de relaxamento (RD) de 2 segundos. Será utilizada a técnica de supressão do sinal da água para reduzir a razão sinal ruído. Os decaimentos livre de indução (FID) passaram por transformadas de Fourier com um line broadening (LB) = 0,3 Hz. O espectro de J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos por 128 incrementos em 8K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz e 60 Hz em acoplamento spin-spin com RD = 1,5s. O espectro COSY ^1H - ^1H foi obtido com 32 pulsos por 512 incrementos em 2K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz em ambas as dimensões com RD = 1,5s. Os espectros HMBC ^1H - ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C foram adquiridos com 64 pulsos por 512 incrementos em 4K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz para o ^1H e 22,149 KHz para o ^{13}C com RD = 1,5s. Os espectros resultantes serão calibrados com o TSP como padrão interno em 0,0 ppm, usando o programa TopSpin RMN (versão 2.1, Bruker). Os espectros de RMN- ^1H otimizados serão reduzidos (δ 0,3-10,0 ppm) e divididos em regiões de largura (bucket = 0,0004 ppm), normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2014a. As regiões de δ 4,7-5,0 e 3,24-3,33 δ foram excluídas da análise por causa dos sinais residuais de água e de metanol. A análises estatística que serão efetuadas são: PCA e OPLS-DA usando o software SIMCA-P (versão 14.0, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de única variância (UV).

Resultados e Discussão

Quando analisadas as modificações no metaboloma da planta, no sítio restrito ao de entrada da lagarta de *Diatraea saccharalis*, verificaram-se alterações no perfil dos metabólitos entre os três grupos estudados: plantas sadias (controle), plantas submetidas a dano mecânico (controle positivo) e as plantas submetidas a herbivoria (Figura 1). Esses resultados indicam que há uma resposta específica a herbivoria, possivelmente à presença dos eliciadores presentes na secreção oral das lagartas. Além disso, o dano causado pela lagarta é capaz de induzir localmente a biossíntese de compostos específicos. A continuação do estudo e a identificação destes compostos podem auxiliar na descrição do mecanismo de defesa local, bem como fornecer um possível marcador ou composto de defesa na espécie vegetal.

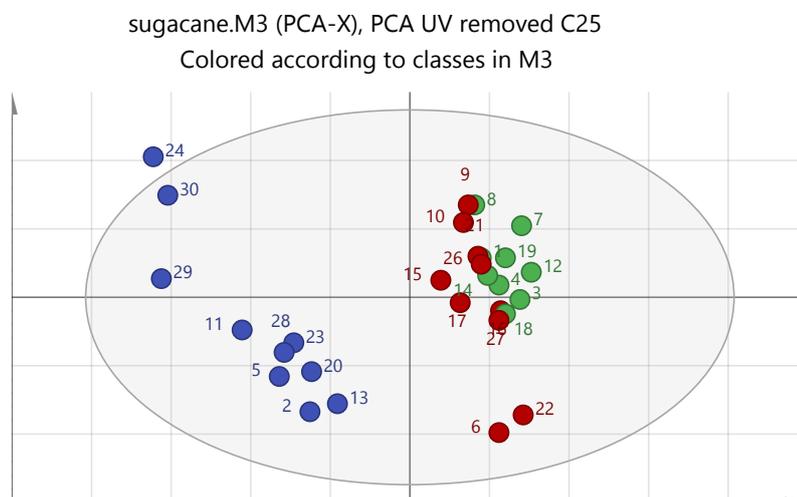


Figura 1. PCA escores dos perfis de metabólitos de tecido de cana-de-açúcar amostradas após 120h de bioensaiode herbivoria (PCA). Score plot das amostras. As plantas foram submetidas a herbivoria por *D. saccharalis* (azul), controle positivo aplicando dano mecânico (vermelho) e plantas sadias (verde).

Foram realizados os bioensaios com cinco genótipos do BAG do complexo Saccharum. As lagartas foram submetidas à herbivoria e retiradas do confinamento às plantas e pesadas após 14 dias. Quando analisadas as médias de ganho de peso, observa-se diferença entre os genótipos, demonstrando que as lagartas ganharam menos peso quando se alimentaram de plantas do gênero *Miscanthus* e *Erianthus* (Tabela 1). No entanto os testes aplicados não demonstraram diferença estatística significativa. Estudos adicionais como a quantificação do ganho de peso em diferentes tempos de herbivoria, a utilização um número maior de repetições e de genótipos testados são necessários para melhorar a qualidade dos resultados deste bioensaio.

Tabela 1. Ganho de peso de lagartas de *D. Saccharalis* em diferentes genótipos do Complexo Saccharum.

Genótipo	Ganho de Peso* (%)
<i>Miscanthus</i> sp. Fiji 10	7,54
<i>Saccharum</i> híbrido US 67-22-2	92,72
<i>Saccharum spontaneum</i> US72_1319	48,07
<i>Erianthus arundinaceus</i> Ij76-358	40,05
<i>Erianthus arundinaceus</i> Ij76-358	32,48

*Média da massa de 4 lagartas alimentando-se por 14 dias em 4 plantas diferentes

Conclusões

A diferença de perfil metabólico durante a herbivoria mostra que há uma resposta específica da planta no local em que a lagarta utiliza como porta de entrada na planta.

Embora sem significância estatística, as médias de ganho de peso de lagartas de *D. Saccharalis* alimentando-se em diferentes genótipos do Complexo Saccharum foram diferentes.

Referências

- AGRAWAL A. A.; STRAUSS, S.Y.; STOUT, M. J. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. **Evolution**, v. 53, p. 1093-1104, 1999.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 2, p. 90-98, 2014.
- BERGELSON, J.; ROUX, F. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Review Genetics**, v.1 1, p. 867-879, 2010.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DICKE, M.; LORETO, F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in plant science**, v. 15, n. 3, p. 115, 2010.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. . Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical reviews in plant sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.
- NALAM, V. J.; NACHAPPA, P. The role of roots in plant defense responses to aboveground herbivores. In: **ROOT Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 369-384.
- PALMGREN, M. G.; EDENBRANDT, A. K.; VEDEL, S.E.; ANDERSEN, M. M.; LANDES, X.; ØSTERBERG, J. T.; FALHOF, J.; OLSEN, L. I.; CHRISTENEN, S. B.; SANDØE, P.; GAMBORG, C.; KAPPEL, K.; THORSEN, B. J.; PAGH, P. Are we ready for back-to-nature crop breeding? **Trends Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 155-164, mar. 2015.

RIFFEL, A.; BENISIO FILHO; OLIVEIRA, J.; BIRKETT, M.; ZHOU, J. J.; PICKETT, J.; SANTANA, A. A GENE CODING FOR a putative terpene synthase from sugarcane is induced during diatraea saccharalis infestation. INTERNATIONAL CHEMICAL ECOLOGY CONFERENCE, 2013, Victoria. Abstracts... Victoria, AT: International society of Chemical Ecology, 2013.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. New York: Oxford University Press, 2005.

STEWART-JONES A.; POPPY, G. M. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 845-864, 2006.

TURLINGS, T. C.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. **Advances in insect chemical ecology**, v. 2, p. 21-75, 2004.

VOELCKEL, C.; BALDWIN, I. T. Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. **Plant Journal**, v. 38, p. 650-663, 2004.