

2.1 Isolamento e identificação de flavonóides envolvidos na resistência de genótipos de soja a lagartas e percevejos fitófagos

Clara Beatriz Hoffmann-Campo; S.H. Miyakubo; G.C. Piubelli¹; A.M. Toledo²;
Antonio Carlos Ferreira Mendes; Sérgio Henrique da Silva

Experimento 1: Identificação e quantificação de flavonóides em genótipos de soja resistentes a insetos

Os genótipos de soja resistentes a insetos (PI 227687, PI 274454, PI 229358 e 'IAC-100') e 'BR-16' (suscetível) foram semeados na casa-de-vegetação da Embrapa Soja, Londrina. No estágio V6, retirou-se o 4º trifólio de cada genótipo que, no laboratório, foi cortado sendo 500 mg de cada genótipo extraídas com 5 mL de MEOH 80%. Após banho-maria (90°C) até fervura, as amostras permaneceram em agitação constante (150 r.p.m.) por, aproximadamente, 18h. O sobrenadante foi transferido para beakers e armazenados em geladeira, até completa secagem (\pm 96h). Após secagem, houve ressolubilização em 1 mL de MEOH 80%, armazenado-se as amostras no freezer para posterior análise.

As análises foram realizadas no HPLC Shimadzu, modelo SPD-M10 VP, em coluna de fase reversa CLS-ODS-C18 (M) do grupo octadesyl (4,6 mm e 250 mm). Na eluição dos flavonóides, foi utilizado um sistema gradiente linear. A fase móvel consistiu de dois solventes 2% de ácido acético (HOAc) e (B) uma solução composta de MeOH, ácido acético e água (18:1:1;MeOH:HOAc:H₂O). O sistema inicial do gradiente foi composto 75% de HOAc, atingindo 35%, aos 23 minutos, e voltando à condição inicial (75% de HOAc) aos 25 min, permanecendo, assim, até os 30 min, para a limpeza da coluna. O fluxo do solvente foi de 1,0 mL/min e a absorção de UV foi medida a 260 nm.

¹ UFG-pós-graduando

² Unesp-Jaboticabal

Na identificação e quantificação de flavonóides em genótipos de soja com característica de resistência a insetos pragas, observou-se a maior concentração do flavonol rutina na PI 227687, em comparação com os outros genótipos (Tabela 2.1). Enquanto o teor de rutina da 'IAC-100' foi intermediário e não diferiu daquele dos genótipos PI 274454 e PI 229358 que fazem parte da sua genealogia. Daidzina não foi observada nos extratos de folhas dos genótipos analisados e a concentração de genistina da PI 274454 foi duas vezes maior do que a dos demais genótipos.

TABELA 2.1. Concentração (mg/g de folhas secas \pm epm) de rutina e genistina em genótipos de soja com resistência a insetos.

Genótipos	Concentração (mg/g)	
	Rutina	Genistina
PI 227687	3.682 \pm 0.416 a	0.122 \pm 0.005 b
PI 274454	1.472 \pm 0.282 b	0.258 \pm 0.030 a
'IAC-100'	0.972 \pm 0.082 bc	0.142 \pm 0.011 b
PI 229358	0.212 \pm 0.021 c	0.136 \pm 0.005 b
F valores	37.65***	13.28***

Médias seguidas pela mesma letra não são diferentes pelo teste de Tukey, 5% probabilidade

*** P < 0.001

Experimento 2: Produção e isolamento de fitoalexinas da soja

As gliceolinas, substâncias induzidas (fitoalexinas) da soja, pertencem ao grupo dos isoflavonóides pterocarpanos e, embora, primariamente fungitóxicas, podem também afetar negativamente nematóides e insetos. A identificação e quantificação das substâncias é importante para o entendimento das interações químicas das plantas com suas pragas. Assim, o conhecimento de suas propriedades cromatográficas e a disponibilidade de padrões (substância pura) foi o objetivo do estudo realizado no Laboratório de Interações Inseto-Planta e Fitoquímica da Embrapa Soja.

Sementes de soja ('IAC-100') foram semeadas em areia em 30 caixas plásticas (100 sementes/ caixa). Uma semana após a semeadura, hipocótilos e cotilédones foram perfurados com agulhas ou cortadas com lâminas, respectivamente, aplicando-se sobre a lesão uma gota do corante Rosa de Bengala para elicitar a produção de gliceolinas, conforme descrito por Landini e colaboradores (*Phytochemistry* 62: 865-874, 2003). Depois de 48h sob luz ultra-violeta (UV), hipocótilos e cotilédones foram colhidos e, separadamente, embebidos em 80% de etanol (EtOH) e trituradas com processador de alimento, tipo "blender". O extrato foi, então, sonicado, por 20 min., e filtrado através de pano de fralda. Após a filtração, o volume do extrato foi reduzido em rotavapor para 200 mL e transferido para coluna aberta não-iônica de Amberlite para eliminar contaminantes. Quando a amostra estava completamente desenvolvida na fase estacionária da coluna (Amberlite), adicionaram-se 250 mL de água pH2, mais 250 mL de água pH7, descartando-se o líquido resultante. Para coletar as gliceolinas, acrescentou-se 500 mL de metanol 80% (MeOH), seguido de 600 mL de MeOH puro. Frações de 50 mL foram coletadas, após a cada adição do solvente e redução de volume em rotavapor, e uma alíquota (20 mg) foi injetada no HPLC para a identificação dos três isômeros de gliceolinas. Para a separação de gliceolinas das isoflavonas, utilizou-se coluna C18 pré-empacotada (Waters Sep-Pak) com 30g da fase estacionária segundo descrito por Berhow (*Flavonoids in cell function*, edited by Béla Buslig and John Mantehey, 2002).

Os resultados indicaram que a metodologia utilizada na produção e separação de gliceolinas foi adequada, observando-se que os três isômeros (I, II e III) foram produzidos, em quantidades relativamente altas, no material vegetal (Figura 2.1). Os tempos de retenção dos isômeros e os respectivos espectros estão na Figura 2.2, observando-se que, embora muito semelhantes, existe a possibilidade de identificação dos mesmos e a execução de análises qualitativas. Em relação à quantificação, experimentos adicionais, envolvendo colunas preparativas que permitam a injeção de volumes maiores de extrato e a posterior coleta das substâncias puras, precisam ser desenvolvidos.

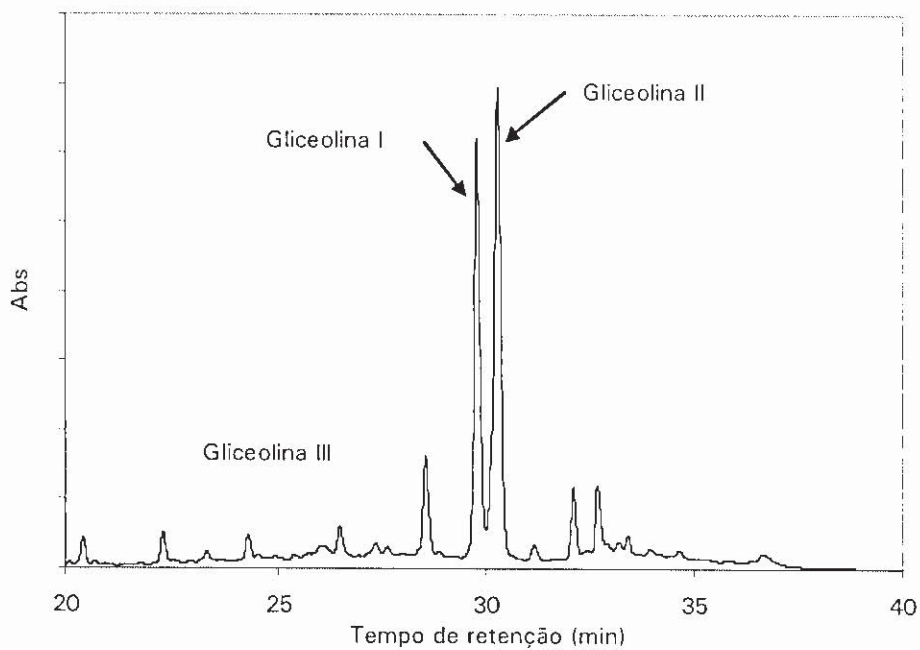


FIG. 2.1. Traços obtidos no HPLC de extratos preparados com hipocótilos e cotilédones de 'IAC-100' danificados e elicitados com o corante Rosa de Bengala

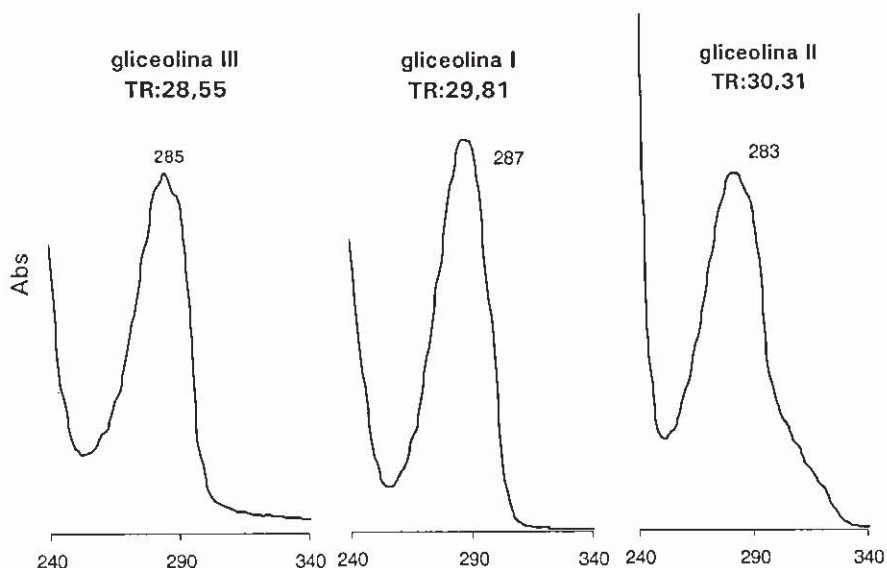


FIG. 2.2. Espectros e absorvância máximos de gliceolinas (III, I e II), obtidos no fotiodo, e respectivos tempos de retenção (TR) na coluna de HPLC



2.2 Atividade biológica de genótipos de soja em relação a percevejos sugadores de sementes

Décio Luiz Gazzoni; Carlos Alberto Arrabal Arias; Oriverito Tonon

Experimento 1: Teste de linhagens do programa de resistência a insetos da Embrapa Soja

Foram selecionadas 17 linhagens do programa de resistência a insetos da Embrapa Soja, comparadas com três cultivares comerciais, utilizadas como padrões. Foi adotado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas experimentais constaram de quatro linhas de soja de quatro metros de comprimento. Os materiais genéticos foram semeados em 27/11/2003, no final do período recomen-