

Prospecção Química de Genótipos de Milho com Resistência à Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

[Previous](#) [Top](#) [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

¹HÉLIO T. PRATES, ¹PAULO A. VIANA, ¹PAULO E. O. GUIMARÃES, ²DÉLIO S. RASLAN, ³CLAUDIA M. JAMAL.

¹Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: htprates@cnpmis.embrapa.br. ²Depto. Química - ICEX / UFMG. ³Depto. Química – UNIVALE.

INTRODUÇÃO

Os danos causados por insetos pragas limitam a produtividade do milho cultivado em regiões tropicais e subtropicais. Um dos métodos de controle de pragas, onde o custo é reduzido e não causa efeitos indesejáveis ao ambiente, é o desenvolvimento de cultivares resistentes. Desde meados da década passada, a Embrapa Milho e Sorgo vem desenvolvendo estudos para identificação de fontes de resistência de milho e sorgo as principais pragas e doenças. Estudos sobre a herança e os mecanismos de resistência (Viana e Potenza, 2000) foram conduzidos em alguns genótipos selecionados, sem, contudo conhecer as causas dessa resistência.

Embora o conhecimento do mecanismo, herança e causas de resistência não sejam limitantes para o desenvolvimento de programa de melhoramento visando resistência a insetos e doenças, a elucidação desses parâmetros é muito útil ao progresso do programa, contribuindo para a escolha do método de melhoramento adotado, previsão da duração e eficiência da resistência e ao planejamento de novas linhas de ação a serem seguidas na solução de problemas futuros (Smith *et al.*, 1989).

Plantas são conhecidas por possuírem constituintes químicos que podem efetivamente limitar o dano causado por organismos fitófagos. Plantas cultivadas usualmente são protegidas contra insetos e doenças com defensivos agrícolas. Entretanto, o uso eficiente desses produtos, nem sempre é viável para o pequeno e médio agricultor, devido ao alto custo envolvido, aos riscos de contaminação ambiental e à toxicidade, além do fato de apresentarem sinais de resistência. Uma alternativa aos defensivos está no uso de cultivares resistentes que exploram as defesas naturais da planta. Estes mecanismos de defesa natural são, freqüentemente, metabólitos secundários (aleloquímicos) que são inibidores de alimentação aos insetos pragas (Campos *et al.*, 1990). Portanto, é relevante uma melhor caracterização e exploração do perfil fitoquímico das plantas cultivadas, o qual associado às características de resistência natural pode ser utilizado como forma de minimizar o uso de defensivos e otimizar a produção de alimentos (Prates, 2002).

O milho (*Zea mays* L.) é uma das mais importantes culturas atualmente em uso pelo ser humano, como fonte de alimento e como matéria prima para processos industriais. Ele está sujeito ao ataque de cerca de 90 insetos fitófagos. Estudos anteriores mostram que linhagens e variedades de milho tem apresentado propriedades fitoquímicas que limitam os danos provocados por insetos. A DIMBOA e outras benzoxazolinonas do milho foram extensivamente estudadas como substancias responsáveis pela resistência da planta a determinadas espécies de insetos. (Philogène e Arnason, 1995).

Embora muitos estudos tenham sido feitos sobre as causas da resistência no milho existem ainda muitos aspectos a serem investigados, especialmente ao nível da identificação de substâncias envolvidas nos mecanismos fitoquímicos da resistência como instrumento para entomólogos, melhoristas e biotecnologistas na busca de novas fontes de resistência (Bergvinson *et al.*, 1997, Warnock *et al.* 2001).

Este trabalho tem como objetivo comparar o perfil cromatográfico obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) de plantas de milho que podem ser exploradas em linhagens e populações de milho selecionadas e que estão sendo melhoradas na Embrapa Milho e Sorgo para obtenção de cultivares resistentes à *S. frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção do perfil cromatográfico de genótipos de milho resistentes e susceptíveis à lagarta-do-cartucho foram coletadas folhas de 25 genótipos, antes e após infestação, sendo 13 resistentes e 12 susceptíveis. Estes materiais foram cultivados em vasos de 5 L, sendo cinco plantas por genótipo. A infestação foi realizada com 10 lagartas recém-eclodidas por planta na fase de 5-6 folhas. Em seguida foram coletadas cerca de 10 g de folha, em tamanho aproximado de 2 cm. As amostras foram levadas para o laboratório, cortadas em pequenos pedaços e trituradas em gral com pistilo, contendo nitrogênio líquido. O material resultante foi recuperado com 20 mL de metanol e acondicionado em bequer, onde foi acrescentado aproximadamente 200 mL de metanol. Em seguida o material foi submetido a agitação para extração em agitador magnético com aquecimento (65 °C), durante 20 minutos. O extrato metanólico obtido (extrato bruto) (~1g) foi particionado com hexano (EH), mistura CH₃CN:CHCl₃ (3,4:1) (EAC) e com água (EA) (Fig. 1), os quais, após evaporação dos respectivos solventes, foram armazenados em geladeira até o momento da análise por HPLC, conforme metodologia descrita por Prates *et al.* (2003), utilizando Cromatógrafo Líquido, marca Shimadzu, modelo LC-10A, dotado de detetor Photo Diode Array (PDA) e UV/VIS, utilizando coluna analítica C-18, fase reversa. Foram obtidos os perfis dos extratos aquosos (EAs) dos diferentes genótipos antes e após infestação para avaliação qualitativa da composição química destes extratos, na busca de substâncias que evidenciem a diferenciação entre a resistência e susceptibilidade no perfil. O estudo comparativo das similaridades e/ou diferenças dos perfis cromatográficos dos diferentes extratos obtidos para os genótipos contrastantes de milho foram correlacionadas com o grau de resistência e/ou susceptibilidade à lagarta do cartucho. Posteriormente, essas substâncias serão caracterizadas por métodos espectrométricos usuais.



Fig. 1- Fracionamento do extrato bruto

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção do Perfil Cromatográfico dos 25 genótipos de milho estudados, estes foram confrontados com observações realizadas em casa de vegetação e campo quanto aos danos provocados pela lagarta. Esta avaliação permitiu selecionar nos Extratos Aquosos dos genótipos possíveis substâncias de interesse a ser isoladas e caracterizadas, a posteriori. Os cromatogramas dos picos selecionados, juntamente com os respectivos espectros de UV, estão ilustrados na Fig. 2, tanto para os perfis das amostras de milho coletadas antes da infestação com o inseto, quanto perfis obtidos em amostras coletadas após infestação com os insetos.

Em geral, observa-se que há um maior número de picos (substâncias) por perfil nas amostras resistentes, os quais apresentam maior intensidade (equivalente a uma maior concentração) quando comparadas com as susceptíveis antes e após a infestação com o inseto. Assim, nos genótipos resistentes antes da infestação observa-se a um t_R de 9-10 min (exceto no L9) e 23-24 min (exceto no L3) picos com espectros UV iguais exceto para o genótipo 3, cujos espectros não são coincidentes. A um $t_R = 32-33$ min apenas os genótipos resistentes L9 e L8 apresentam a presença de substância, a qual não aparece nos genótipos susceptíveis. Por outro lado, as substâncias presentes nos genótipos L2, L3, L5 após infestação à $t_R = 11-12$ min e 23 -24 min não aparecem nos genótipos susceptíveis, onde apenas à $t_R = 10 -11$ min aparecem picos nos genótipos L17 e L18. O HPLC mostra-se, portanto, como instrumento analítico de alta sensibilidade nessa diferenciação, permitindo identificar substâncias que servirão como indicador na prospecção de fontes de genes para resistência à lagarta-do-cartucho.

