

Indução de metabólitos secundários em plantas de soja tratadas com diferentes concentrações de Metil-Jasmonato

GOIS, M. S.^{1,5}; OLIVEIRA, T.B.^{2,5}; SOUZA, M.A.^{3,5}; LUSKI, P.G.G.^{3,5}; SALVADOR, M.C.^{4,5}; UEDA, T.E.^{4,5}; GRAÇA, J.P.⁵; OLIVEIRA, M.C.N. de⁵; HOFFMANN-CAMPO, C.B.⁵.

¹Universidade Norte Paraná, mayarasgois@gmail.com; ²Universidade Federal de Lavras; ³Centro Universitário Filadélfia; ⁴Universidade Estadual de Londrina; ⁵ Embrapa Soja.

Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo (*Glycine max* (L.) Merrill) ficando atrás apenas dos EUA (CONAB, 2012). Devido à importância da cultura no país, diversas pesquisas que visam maior eficiência no manejo para atingir melhores índices de produtividade vêm sendo realizadas. O uso excessivo de agrotóxicos pode ocasionar danos ao ambiente, levando ao desequilíbrio ambiental e a seleção de populações de pragas e doenças resistentes. Em função destes fatores, a procura por medidas de controle viáveis vem crescendo, respondendo assim, aos anseios da sociedade pela preservação ambiental e por alimentos sem contaminação. Uma alternativa com potencial a ser aplicada é a indução de resistência – método usado para reduzir a severidade de doenças causadas por fitopatógenos. Trata-se do fenômeno pelo qual as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa latentes ativados sendo capaz de responder contra o ataque de patógenos (CONRATH, 2011). Outra forma de indução é observada através da aplicação dos fitormônios: jasmonatos, etileno e ácido salicílico (VAN LOON, et al., 2006). O ácido jasmônico e o seu éster metil jasmonato (MeJA) encontram-se largamente distribuídos em tecidos vegetais, destacando-se como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica das plantas por alterar fundamentalmente a biossíntese de compostos fenólicos. No entanto, os modos de ação geralmente envolvem rotas multivariadas, que são específicas para cada vegetal. Pesquisas que avaliam os possíveis mecanismos do metil jasmonato mostraram o aumento do conteúdo de fenilpropanoides pela elicitação da atividade da fenil amônia liase (PAL) em até seis vezes (SIRCAR; MITRA, 2008). Os compostos fenólicos são antifúngicos, sendo acumulados no local da infecção, reduzindo ou restringindo o crescimento do patógeno. A eficiência de elicitores é passível de ser avaliada através da determinação do conteúdo de fenilpropanoides, da atividade fotossintética, de enzimas chaves da rota biossintética, análises anatômicas e de crescimento das plantas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações de MeJA que desencadeie melhor indução de compostos secundários em plantas de soja.

Material e Métodos

As sementes foram obtidas no banco de germoplasma da Embrapa-Soja, sendo utilizada no trabalho a cultivar BRS MG 772 resistente a ferrugem asiática da soja. Foram semeadas 10 sementes em vasos plástico de 5 litros e após a emergência realizou-se raleio deixando apenas 5 plantas por vaso. Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65 % até estágio V5 (FEHR et al., 1971). Neste estágio as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos via pulverização: Água (controle); Etanol (surfactante); MeJA 56,25 µM; MeJA 112,5 µM; MeJA 225 µM e MeJA 450 µM.

As plantas tratadas com MeJA foram mantidas em outra casa de vegetação sob as mesmas condições de temperatura e umidade descritas anteriormente, para evitar a indução nas plantas controle (Água e Etanol), pois o MeJA é conhecido como um fitormônio volátil. Após a aplicação dos tratamentos, as folhas foram coletadas em intervalos de 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas, acondicionadas em nitrogênio líquido, e logo em seguida armazenadas em freezer (-20°C) até a extração e análise dos flavonoides. Para extração e quantificação dos compostos, as folhas foram pesadas, moídas e extraídas com metanol 90% na proporção de 1:10 (m:v) e levadas ao banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram então centrifugadas a 6000 rpm (9880 g) a 2°C por 5 min, e com o auxílio de uma pipeta Pasteur o sobrenadante foi transferido para outro tubo e depois secas a vácuo. As amostras foram ressolubilizadas com 1,5 mL de metanol 80% e filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm e analisadas em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – Shimadzu – modelo Prominence. As concentrações das agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), assim como das formas glicosídica (daidzina, glicitina, genistina) e malonil glicosídica (malonil daidzina, malonil glicitina, malonil genistina), rutina e ácido salicílico foram identificadas por meio da comparação de espectro e tempo de retenção dos padrões com os valores obtidos em cada amostra analisada.

Resultados e Discussão

A aplicação do indutor MeJA desencadeou a produção de compostos secundários em plantas de soja. A concentração de daidzina se mostrou variável em relação aos diferentes tratamentos (Figura 1A), porém em geral teve sua concentração mais elevada sempre nas plantas tratadas com MeJA, na concentração de 450 µM nos períodos de 120 e 144 horas. A isoflavona genistina foi identificada a partir das 144 horas (Figura 1B) nas concentrações de 225 e 450 µM, no entanto, em 168 horas esta substância foi identificada em todos os tratamentos, com uma redução de sua concentração em relação às plantas tratadas com Água e Etanol. O MeJA é um fitormônio conhecido por induzir a cascata do ácido octadecanóide que leva a expressão de genes relacionados à resistência a pragas e doenças (THOMMA et al., 2000), e na produção de compostos secundários de defesa (WALKER et al., 2002), porém, nesse estudo, não se observou diferença em relação aos controles (Água e Etanol).

A concentração de ácido salicílico apresentou um aumento gradativo principalmente em 144 horas (Figura 2A), nas concentrações de 225 e 450 µM. Já em 168 horas foi observada uma menor concentração de ácido salicílico quando comparado com as plantas tratadas com Água e Etanol, no entanto, entre as concentrações de MeJA, a de 450 µM mostrou a maior indução deste composto. A capacidade em desencadear a produção de fenóis e flavonoides foi observado em plantas de *Panax ginseng* após a aplicação de MeJa (ALI et al., 2007). Já em relação a rutina, a mesma mostrou ser constitutiva em todos os tratamentos (Figura 2B), sendo observado um aumento da sua concentração em 120 horas quando aplicado 225 µM de MeJA, seguido de 144 horas com 112,5 µM MeJA.

A concentração de malonil genistina aumentou em 96 e 120 horas (Figura 3A), para as plantas aonde aplicou-se 450 µM, e detectada apenas em 168 horas nesta concentração. A aglicona gliciteína mostrou maior concentração em 96 horas (Figura 3B), nas plantas com 450 µM de MeJA, este mesmo resultado se manteve em 120 e 168 horas, assim como as plantas tratadas com 56,25 µM em 168 horas. Segundo Junlan e Yue (2011), a concentração de 450 µM foi a concentração apropriada para induzir a síntese de isoflavonas em soja, entretanto em nossos testes, essas concentrações foram variáveis e não seguiram o padrão esperado.

Desta forma, o experimento está sendo repetido utilizando-se concentrações maiores.

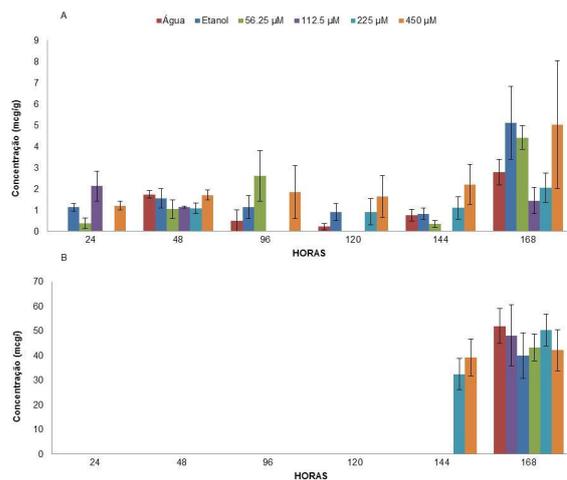


Figura 1. Concentração de daidzina (A) e genistina (B) em plantas tratadas com diferentes concentrações de MeJA. Média de cinco repetições e erro padrão.

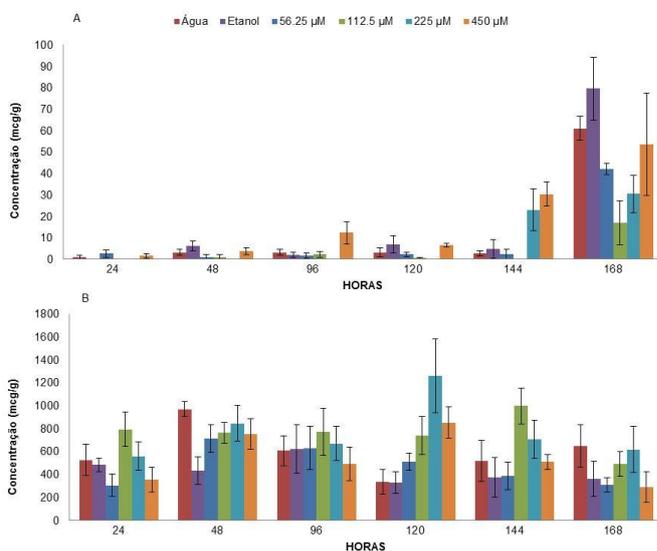


Figura 2. Concentração de ácido salicílico (A) e Rutina (B) em plantas tratadas com diferentes concentrações de MeJA. Média de cinco repetições e erro padrão.

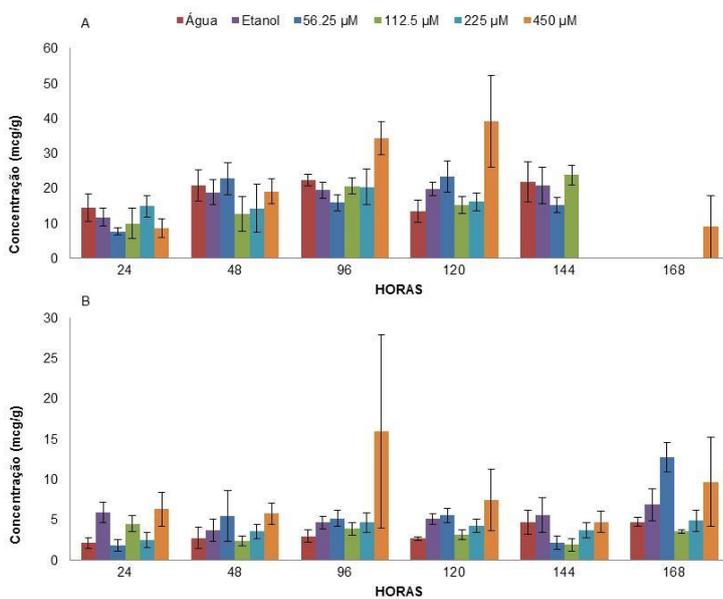


Figura 3. Concentrações de malonil-genistina (A) e gliciteína (B) em plantas tratadas com diferentes concentrações de MeJA. Média de cinco repetições e erro padrão.

Conclusão

Dentre as concentrações testadas de MeJA, a de 450 μM foi a que apresentou indução de metabólitos secundários em plantas de soja.

Referências

ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. **Molecules**, v.12, p. 607-621. 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_12_16_15_32_boletim_portugues_junho_2012.pdf >. Acesso em: 25 abr. 2013.

CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends Plant Sci**, v.16, p.524–531, 2011.

FEHR, W.R.; CAVINESS C. E.; BURMOOD D.T.; PENNINGTON J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v.11, n.6, p.929-931, 1971.

JUNLAN, M.; YUE, Z. Effect of exogenous methyl jasmonate on pathway of isoflavone synthesis in Soybean. **Journal of Northeast Agricultural University**. v. 42(5), p.14-18, 2011.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.407-414, 2008.

THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; Broekaert, W.F.; CAMMUE, B.P.A.. Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. **Plant Physiology Biochemistry**, v.38, p.421-427, 2000.

VAN LOON, L. C., REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol**, v.44, p.135–162. 2006.

WALKER, T.S., BAIS H.P., VIVANCO, J.M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. **Phytochemistry**, v.60, p.289-293, 2002.