

# Resistência induzida em genótipos de soja infestados por *Bemisia tabaci* biótipo B

LUSKI, P.G.G.<sup>1,5</sup>; VIEIRA, S. S.<sup>2,5</sup>; GRAÇA, J.P.<sup>5</sup>; GOIS, M. S.<sup>3,5</sup>; UEDA, T.E.<sup>4,5</sup>; SOUZA, M.A.<sup>1,5</sup>; SALVADOR, M.C.<sup>4,5</sup>; OLIVEIRA, M. C. N. de<sup>5</sup>; HOFFMANN-CAMPO, C.B.<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia- UNIFIL, pamela.luski@hotmail.com; <sup>2</sup>Instituto Agronômico de Campinas,

<sup>3</sup>Universidade Norte Paraná; <sup>4</sup>Universidade Estadual Londrina; <sup>5</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

As ninfas e adultos de *B. tabaci* biótipo B sugam a seiva do floema das plantas hospedeiras, podendo causar danos diretos e indiretos às mesmas (INBAR; GERLING, 2008). Quando esse inseto ocorre em altas populações, seu ataque resulta em enfraquecimento da planta, devido à extração de grandes quantidades de seiva. Com isso, ocorre o aumento do teor de etileno na folha e a consequente desfolha precoce, afetando o desenvolvimento e rendimento das plantas (VIEIRA et al., 2011). Além disso, durante a sucção da seiva, os insetos excretam uma substância açucarada, conhecida como *honeydew*, que favorece a formação do crescimento de fungos deixando a folha enegrecida, sintoma conhecido como fumagina (OLIVEIRA et al., 2001), que afeta negativamente os processos fisiológicos da planta.

Os mecanismos de defesa da planta abrangem uma série de características morfológicas e também um complexo de substâncias químicas, que podem torná-la repelente, tóxica ou, de algum modo, inadequada para os insetos-praga (PIUBELLI, 2004). Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonoides, derivados da via dos fenilpropanoides, que, em geral, são mais abundantes nos genótipos resistentes às pragas (HOFFMANN-CAMPO, 1995). Desta forma, compreender as rotas bioquímicas nas plantas, através da identificação de compostos químicos que promovam a resistência da planta pode ajudar a acelerar a seleção e o melhoramento de novas cultivares, com característica de resistência. Essas cultivares podem reduzir a incidência da praga, resultando em menor perda na produção. Assim, o presente estudo objetivou identificar e quantificar as substâncias químicas encontradas em genótipos de soja infestados e não infestados por *B. tabaci* e que possam estar relacionadas à defesa da planta.

## Material e Métodos

Os genótipos de soja 'IAC 17', 'IAC 19' e 'IAC 24', que apresentam algum tipo de resistência a insetos; 'Barreiras', 'Doko' e 'Vencedora', que no campo apresentaram menor incidência de fumagina (VIEIRA et al., 2011, VALLE et al., 2012); e 'IAC Holambra Stewart', considerada padrão de suscetibilidade à mosca-branca (VIEIRA et al., 2011) foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade para 10 litros. Duas plantas foram mantidas por vaso em casa de vegetação em condições controladas ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$  temperatura, 80% umidade relativa e 14 horas fotoperíodo). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com arranjo fatorial de sete genótipos x seis estádios fenológicos x duas intensidades de infestação da praga x cinco repetições. Os estádios fenológicos avaliados foram  $V_3$ ,  $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $V_7$ ,  $V_8$ , segundo Fehr; Caviness (1977). As intensidades de infestação consistiram de plantas de soja dos genótipos citados infestadas por

*B. tabaci* biótipo B, e outro grupo de plantas não-infestado (controle). Para infestação, as plantas foram levadas para a criação da mosca-branca que é realizada em uma casa de vegetação de vidro, EM condições controladas de temperatura  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa 80%, e fotoperíodo de 14 horas. Nessas condições, as plantas forma mantidas por 24 horas para que ocorresse a oviposição, posteriormente transferidas para outra casa de vegetação. As plantas não-infestadas foram colocadas em ambiente separado, para evitar a infestação, sendo condições ambientais semelhantes.

Folhas dos diferentes genótipos, dos tratamentos infestados e não-infestados, foram coletadas em cada um dos seis estádios de desenvolvimento da planta. Para a realização das análises, foi coletado o último trifólio completamente expandido de cada planta. Para extração e quantificação das isoflavonas, as folhas foram moídas, pesadas e maceradas com etanol 80% HCl (0,001 mmol), na proporção de 1:10 (m:v) e mantidas em banho de ultrassom, por 20 min. As amostras foram centrifugadas a  $9.880g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 12 min, secas em vácuo, e ressolubilizadas com metanol 80% (1,2 mL) e filtradas em membrana Millipore® 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras foram analisadas em HPLC (High Performance Liquid Chromatography,– Shimadzu – modelo Prominence). As concentrações de rutina, genistina, malonil genistina e da aglicona genisteína, foram calculadas através da comparação de espectro obtido no UV (260 nm) e o tempo de retenção (min.) de cada amostra, com o dos respectivos padrões de cada composto.

## Resultados e Discussão

Nas análises cromatográficas dos extratos das folhas dos genótipos estudados foram identificados o flavonol rutina e as isoflavonas genistina, malonil genistina e genisteína, havendo interação significativa entre todos os fatores analisados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da ANOVA para concentrações de flavonoides em sete genótipos de soja (Barreiras, Doko, Vencedora, IAC Holambra, IAC 17, IAC 19 e IAC 24), com dois tratamentos (plantas infestadas e não-infestadas) em seis estádios fenológicos ( $V_3, V_4, V_5, V_6, V_7, V_8$ ).

Fonte Variação	GL	Valor de F			
		Rutina	Genistina	Genisteína	Malonil genistina
Genótipo	6	80,91**	80,2**	52,33**	94,33**
Infestação	1	34,15**	15,67**	7,6**	62,9**
Estádio Fenológico	5	16,58**	125,45**	148,93**	77,51**
Genótipo x Infestação	6	10,17**	2,85**	3,93**	12,05**
Genótipo x Estádio	30	2,77**	6,85**	10,94**	34,23**
Infestação x Estádio	5	11,45**	6,67**	10,76**	22,47**
Geno x Infe x Esta	30	1,47*	3,63**	2,16**	7,68**
Resíduo	419	-	-	-	-

Em todos os genótipos, rutina e genistina foram os compostos observados em maior concentração (Tabela 2). Malonil genistina e a aglicona genisteína foram identificadas em menores concentrações e, no caso da malonil genistina, esse composto não foi identificado nos genótipos 'IAC 19', 'IAC Holambra Stewart' e 'Barreiras'. A maior concentração de malonil genistina foi observada em 'Vencedora'.

**Tabela 2.** Concentrações das substâncias (ng/mg) identificadas em folhas de plantas de sete genótipos de soja. (Valores médios gerais das plantas infestadas e não-infestadas).

Genótipo	Genistina		Rutina		Malonil Genistina		Genisteína	
	IAC 17	27,79	± 3,7 a	165,3	± 30,9 b	1,82	± 0,7 b	2
Vencedora	30,63	± 3,6 a	161,3	± 13,8 b	10,7	± 2 d	1,8	± 0,4 ab
IAC 24	33,59	± 4 ab	55,63	± 5,52 a	0,75	± 0,4 ab	1,9	± 0,4 ab
IAC 19	35,78	± 3 ab	304,5	± 30,4 c	0	± 0 a	1,6	± 0,4 ab
IAC Holambra	43,68	± 6,4 b	5,83	± 2,57 a	0	± 0 a	2,4	± 0,3 b
Doko	59,33	± 6 c	149,1	± 12,8 b	3,54	± 1,2 c	1	± 0,3 a
Barreiras	105,7	± 9,3 d	492,8	± 40,2 d	0	± 0 a	6,8	± 1,1 c
CV (%)	73,73		49,49		129,93		83,89	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

De modo geral, as plantas dos genótipos 'IAC 19' e 'Barreiras', infestados por *B. tabaci*, apresentaram as maiores concentrações de rutina (Tabela 3). Em  $V_3$  e  $V_4$  não houve diferença nas concentrações desta substância nos diferentes genótipos, quando infestados. A partir do estágio  $V_5$ , 'IAC 19' e 'Barreiras' tiveram a maior concentração de rutina, sendo o aumento dessa substância em 'IAC 19' gradativo, no decorrer das avaliações nos diferentes estádios fenológicos. Para o genótipo 'Barreiras', a maior concentração desse flavonol foi observada no estágio  $V_6$ , com redução em  $V_7$  e  $V_8$ . Na última avaliação, em  $V_8$ , IAC 19' foi o genótipo com maior concentração de rutina, sendo este o único em que a concentração desta substância diferiu dos estádios  $V_3$ ,  $V_4$  e  $V_5$  dentro e entre as cultivares.

Nas plantas não-infestadas, o genótipo 'Barreiras' apresentou as maiores concentrações de rutina em todos os estádios fenológicos, atingindo o valor mais alto em  $V_7$ . A partir de  $V_5$ , observou-se também o aumento da concentração de rutina em 'IAC 19'. Esse composto não foi detectado no genótipo padrão de suscetibilidade, 'IAC Holambra Stewart', na maioria dos estádios fenológicos, exceto em  $V_3$ , nas plantas não-infestadas; neste, a concentração diferiu da encontrada nos demais genótipos na mesma avaliação.

A concentração de genistina apresentou diferença entre os genótipos infestados por *B. tabaci* (Tabela 4) a partir do estágio  $V_5$ , sendo as maiores concentrações observadas nos estádios  $V_6$ ,  $V_7$  e  $V_8$ . A partir de  $V_5$ , a maior concentração de genistina foi observada na cultivar Barreiras que apresentou aumento até estágio  $V_8$ . Em  $V_5$ , 'IAC 19' teve concentrações semelhantes com as encontradas em 'Barreiras', diferindo das demais. Nas plantas não-infestadas, foi identificada genistina em 'IAC Holambra Stewart' em todos os estádios, exceto na primeira avaliação, em  $V_3$ , no entanto, não houve diferença entre genótipos.

O flavonol rutina, encontrada em alta concentração em 'IAC 19', pode ser a substância química responsável pelo efeito de antibiose desse genótipo às ninfas de *B. tabaci*. A substância já é reconhecida por desempenhar papel importante na defesa da planta de soja contra desfolhadores (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; 2006), sendo um dos compostos identificados em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 e em outros genótipos resistentes a insetos (PIUBELLI et al., 2005). Embora em menor concentração, o isoflavonoide genistina também foi observado na maioria dos extratos foliares dos genótipos estudados por Piubelli et al. (2005) e utilizados pelos programas de melhoramento como fator de resistência a insetos desfolhadores.

Deve ser destacado o fato de que as concentrações de rutina no genótipo 'IAC 19' aumentaram no decorrer das avaliações, sendo que na última avaliação em  $V_8$  a concentração foi 18 vezes maior que na primeira avaliação em  $V_3$ . Embora rutina tenha sido constitutivamente identificada em genótipos com reconhecida resistência a desfolhadores, os dados obtidos indicam indução

**Tabela 3.** Concentrações de rutina (ng/mg) em folhas de plantas de sete genótipos de soja, infestadas e não-infestadas por *Bemisia tabaci* biótipo B, em seis estádios fenológicos, cultivados em casa de vegetação. Infestação média de 10 ninfas/folículo.

Genótipo	Infestado					
	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Barreiras	150,09* a A	193,4* a A	214,9* ab A	593,8 c C	484,8* c BC	335,61* bc AB
Vencedora	39,12 a A	36,86* a A	131,9 ab A	251,4 ab A	103 a A	111,16 ab A
Doko IAC	26,7 a A	17,17* a A	113,8* ab A	178,8 ab A	177 ab A	167,15 ab A
Holambra	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
IAC 19	32,54 a A	46,33 a A	280,3* b AB	389,5 bc BC	412,8 bc BC	596,68* c C
IAC 17	10,21 a A	10,71 a A	132,1 ab A	555,9* c B	100 a A	234,34 ab A
IAC 24	11,89 a A	12,55 a A	34,5 ab A	54,96 a A	33,97 a A	47,76 a A
Genótipo	Não-infestado					
	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Barreiras	488,86 A b	617,8 b ABC	822,2 c BC	568,1 b AB	824,9 d C	619,05 c ABC
Vencedora	77,024 a A	239,3 a A	266,6 b A	191,2 a A	280 bc A	208,23 ab A
Doko IAC	70 a A	204,6 a AB	359,5 b B	147,4 a AB	191,1 abc AB	136,43 ab AB
Holambra	70 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
IAC 19	138,4 a A	203,6 a A	644 c B	254,7 a A	381,8 c A	273,79 b A
IAC 17	57,37 a A	105,7 a A	303,4 b A	221,1 a A	148,8 abc A	103,87 ab A
IAC 24	31,94 a A	63,83 a A	141,1 ab A	51,6 a A	86,55 ab A	96,93 ab A
CV (%)	73,73					

Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\* Diferença significativa entre o genótipo infestado e não-infestado em cada estágio fenológico.

**Tabela 4.** Concentrações de genistina (ng/mg) em folhas de plantas de sete genótipos de soja, infestadas e não-infestadas por *Bemisia tabaci* biótipo B, em seis estádios fenológicos. Infestação média de 10 ninfas/folículo.

Genótipo	Infestado					
	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Barreiras	10,68 a A*	18,42 a A	90,04 b B*	107,97 c B*	113,69 bc B	202,01 d C *
Vencedora	11,83 AB	3,36 a A	58,72 ab C	7,9 a A	31,05 a ABC *	53,08 abc BC
Doko IAC	10,71 a A	0 a A	55,13 ab B	63,02 b B	124,78 c C	89,24 c BC
Holambra	0 a A	8,14 AB	46,4 ab BC	16,86 a AB *	110,71 bc D	81 bc CD
IAC 19	7,16 a A	6,89 a A	50,31 ab B	42,12 ab AB	52,63 a B	48,55 abc AB
IAC 17	0 a A	1,38 AB	26,49 a AB	35,37 ab AB	43,19 a B *	37,33 ab AB
IAC 24	0 a A	1,28 a A	37,02 a AB *	13,51 a A*	74,07 ab B	33,74 a AB
Genótipo	Não-infestado					
	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Barreiras	44,51 a A	46,58 a A	155,21 c B	215,52 d C	142,29 c B	121,1 c B
Vencedora	0 a A	9,48 AB	43,34 ab BC	28,07 ab AB	75,17 ab C	45,59 a BC
Doko IAC	0 a A	10,77 a A	80,84 b B	75,73 c B	105,94 bc B	95,84 bc B
Holambra	0 a A	16,06 a A	18,27 a A	69,83 bc B	82,03 ab B	74,88 ab B
IAC 19	9,93 a A	9,58 a A	64,74 b B	48,8 abc AB	50,57 a AB	38,08 a AB
IAC 17	2,39 a A	4,96 a A	48,92 ab BC	13,01 a AB	78,83 ab C	41,61 a ABC
IAC 24	2,04 a A	5,8 a A	67,7 b B	58,72 bc B	68,52 ab B	40,64 a AB
CV (%)	49,49					

Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\* Diferença significativa entre o genótipo infestado e não-infestado em cada estágio fenológico.

pelo ataque do inseto (elictor), possivelmente em função da sucção contínua de seiva pelas ninfas de *B.tabaci*. A rutina é responsável pelo prolongamento do ciclo de *A. gemmatalis* (GAZZONI et al., 1997; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006) e alta mortalidade em populações da lagarta suscetíveis e resistentes ao baculovírus (PIUBELLI et al., 2006). O efeito negativo de rutina e genistina sobre *A. gemmatalis* foi demonstrado por Salvador (2008); lagartas dessa espécie alimentadas com dieta ou genótipos contendo esses compostos mostraram uma desorganização dos componentes celulares do intestino médio.

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que rutina e genistina podem ser as substâncias que em conjunto com outros fatores podem estar relacionados à resistência do tipo antibiose em 'IAC 19'.

## Referências

- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames, Iowa State University: Cooperative Extension Service, 1977. 12p. Special Report, 80.
- GAZZONI, D. L.; HULSMAYER A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 673- 681,1997.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PHD. Dissertation, The University of Reading, Reading, UK.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBORNE, J.B.; MCCAFFERRY, A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, Holanda, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOSNETO, J.A.; OLIVEIRA, M.C.N.de; OLIVEIRA, L.J. Detrimental effect of rutin on a main soybean defoliator pest, *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1453-1459, 2006.
- INBAR, M.; GERLING, D. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v, 53, p. 431-438, 2008.
- OLIVEIRA, M.R.V.; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v. 20, p. 709-723, 2001.
- PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 152p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M.C.N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal Chemical Ecology**. v. 31, p. 1515-1531, 2005.
- PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M.C.N. de Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatalis* responds differently to dietary rutin. **Entomology Experimentalis Applicata** v. 119, p. 53-60, 2006.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO, A.L.; PINHEIRO, J.B. Adult attractiveness and oviposition preference of *Bemisia tabaci* biotype B in soybean with different trichome density. **Journal Pest Science**, v.85, n4, p.431-442, 2012.

VIEIRA, S.S.; BUENO, A.F.; BOFF, M.I.C.; BUENO, R.C.O.F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Resistance of soybean genotypes to biotype B of the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), **Neotropical Entomology**, v.40, n.1, p. 117-122, 2011.