

A ANÁLISE DO METABOLOMA COMO FERRAMENTA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM PRAGAS EM CULTIVARES DE MANDIOCA

Regina S. Acácio Melo^{1*}, Thyago F. L. Ribeiro¹, Demetrios J.A. Oliveira¹, João G. da Costa³, Alessandro Riffel³, Adilson R. Sabino², Edson S. Bento², Antônio Euzébio G. Santana¹

1. Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), Universidade Federal de Alagoas-UFAL.
2. Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN), UFAL.
3. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Maceió/AL - Brasil.

Resumo:

Dentre as principais culturas agrícolas do Brasil destaca-se a mandioca (*Manihot esculenta*), a qual tem sofrido perdas consideráveis devido ao ataque de insetos-praga. O controle destas pragas é realizado principalmente com pesticidas, que ao mesmo tempo que controlam as pragas, são alvo de dúvidas por causarem problemas à saúde pública, econômicos e ambientais. Assim, a descoberta de metabólitos de defesa da planta envolvidos na resistência aparece como uma alternativa viável e ecologicamente correta para atuar conjuntamente no controle de praga. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, através da análise do metaboloma, identificar os possíveis metabólitos envolvidos na resistência de cultivares de mandioca. Os cultivares utilizadas foram Equador 72 (resistente) e BRS JARI (susceptível). Os metabólitos foram obtidos por extração com solvente e identificados utilizando Ressonância Nuclear Magnética (RMN) e os dados processados utilizando os TopSpin versão 2.1 (Bruker) e identificados com o auxílio do programa Chenomx, análise STOCYSY e o site Human Metabolome Data Base (HMDB). A cultivar resistente apresentou como principais metabólitos discriminantes rutina e kaempferol, flavonóides constantemente relacionados à defesa da planta. Esses resultados demonstram que a análise do metaboloma pode ser uma poderosa ferramenta para identificação de moléculas envolvidas na defesa de plantas, a ser aplicada adicionalmente a programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Palavras-chave: Insetos-praga; Metabolômica; *Manihot esculenta*

Apoio financeiro: CAPES, CNPq, INCT - Semioquímicos na Agricultura e Embrapa

Introdução:

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo. Dentre as principais culturas, a mandioca é uma cultura com forte influência socioeconômica, principalmente para a agricultura familiar. É um dos alimentos mais consumidos no mundo, principalmente nas regiões tropicais, onde o cultivo ocorre em maior intensidade. De acordo com o último levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2014), o Brasil é o quarto maior produtor, com uma produção de 23,24 milhões de toneladas. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de raiz de mandioca atingiu 23,71 milhões de toneladas no ano de 2016, com uma área colhida de 1,55 milhões de hectares (CONAB, 2017). Apesar da alta produção agrícola a cultura sofre ainda com uma alta incidência de pragas, o que acaba acarretando uma considerável redução da produtividade. Por se tratar de uma cultura de ciclo longo, está sujeita a diversos ataques de insetos e ácaros, que podem causar danos severos à cultura e resultar em perdas no rendimento. Já foram identificadas cerca de 200 espécies de insetos e ácaros que atacam esta cultura. Dentre os principais insetos-praga estão: percevejo-de-renda, *Vatiga illudens* (Drake, 1922), mandarová (*Erinnyis ello ello* L.), ácaros (*Mononychellus tanajoa* e *Tetranychus urticae*), diversas espécies de mosca-branca e a cochonilha (OTSUBO et al., 2002; PIETROWKI et al., 2010).

Atualmente o principal método de controle é a utilização de inseticidas químicos que, apesar de sua eficácia, podem causar danos ambientais se acumulando no ambiente e podem trazer diversos problemas a saúde humana. A busca de metabólitos envolvidos na defesa de plantas, bem como a busca do entendimento dos mecanismos de defesa das plantas frente ao ataque de herbívoros surge como promissora ferramenta na tentativa de subsidiar programas de melhoramento genético e a biotecnologia de informação para o desenvolvimento de cultivares de plantas resistentes.

Portanto, este trabalho visa, através do estudo do metaboloma de cultivares de mandioca, promover o avanço do conhecimento sobre os mecanismos de defesa desta cultura e a identificação de novas moléculas para uma possível aplicação no manejo de pragas. O trabalho procurou identificar os metabólitos

solúveis responsáveis ou que colaboram com a resistência da mandioca a pragas podendo servir também como uma ferramenta para o melhoramento genético no desenvolvimento de cultivares mais resistentes.

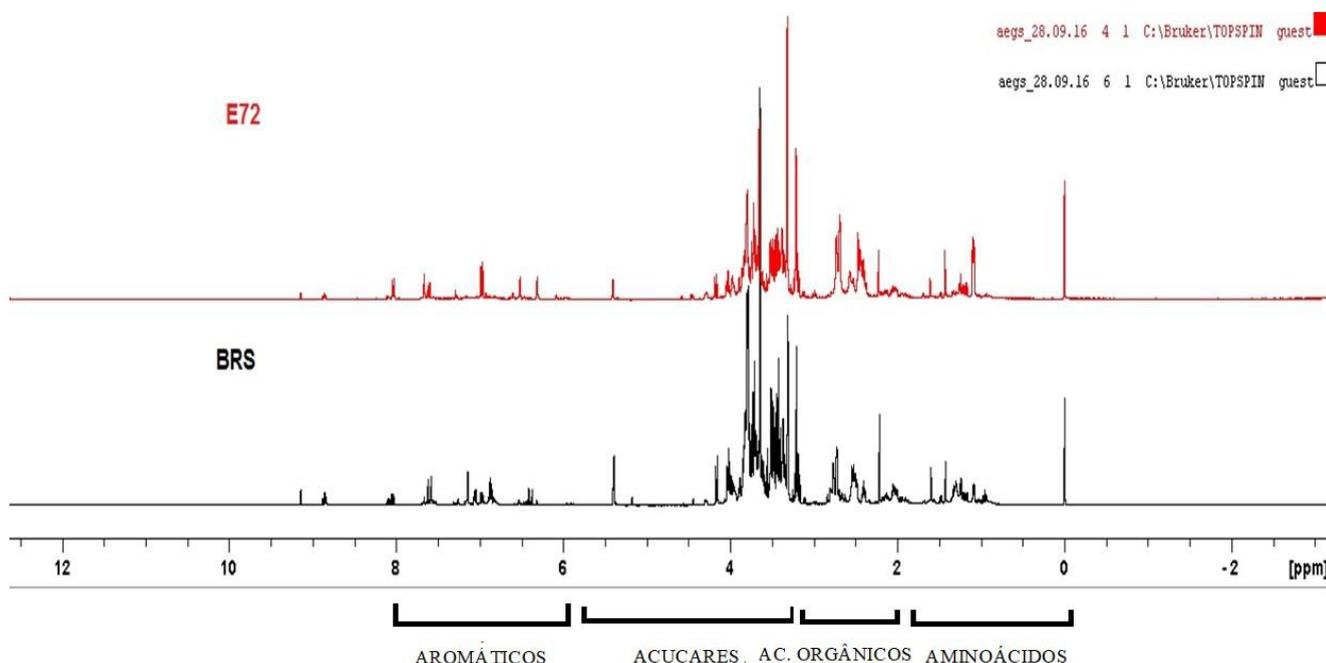
Metodologia:

Foram utilizadas para avaliação dos metabólitos solúveis duas cultivares de mandioca uma resistente (Equador 72) e outra susceptível (BRS JARI). As cultivares fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Esse material foi propagado a partir de manivas e mantido em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade ambiente. As plantas utilizadas para coleta dos metabólitos solúveis tinham aproximadamente quarenta e cinco dias de cultivo e estavam sadias. Amostras de tecido foliar foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Posteriormente, transferiu-se 50 mg de folhas liofilizadas para tubos tipo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 500 µL de metanol-d₄ e 500 µL de tampão fosfato em água deuterada pH = 6.0 contendo 0.01% de sal de sódio do ácido trimetilsilil propiônico (TSP). Em seguida o material foi submetido a ultrassom por 20 minutos, sendo, em seguida centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi coletado para a análise de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram analisados a 20 °C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio. O MeOD-d₄ foi usado para o chaveamento do campo magnético ("lock"). As sequências de pulsos de pré-saturação NOESYGPPR, ZGPR e ZGCPPR foram usadas para otimização das análises metabolômica e cada espectro de RMN-1H foi realizado com 64 pulsos. O experimento J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos. O experimento COSY 1H-1H foi realizado com 32 pulsos. O experimento TOCSY 1H-1H foi realizado com 32 pulsos. Os experimentos HMBC 1H-13C e HSQC EDITADO 1H-13C foram realizados com 64 pulsos. Os espectros foram processados com o emprego do software TopSpin versão 2.1 (Bruker), com uma linha de alargamento (lb) = 0,3 Hz e correção da fase, correção da linha de base e calibração pelo padrão interno (TSP) com sinal em 0,0 ppm. A identificação dos metabólitos foi realizada com o auxílio do programa Chenomx, análise STOCSY (foi utilizado o programa MATLAB) e o site Human Metabolome Data Base (HMDB).

Resultados e Discussão:

A análise dos metabólitos solúveis dos cultivares Equador 72 (resistente) e BRS Jari (Susceptível) de mandioca, em plantas sadias, mostraram perfis metabolômicos distintos. Observaram-se compostos em concentrações diferentes entre as duas cultivares. Os resultados da aplicação do OPLS-DA mostraram uma boa separação dos metabólitos presentes em ambos os cultivares. Foram identificadas algumas classes de metabólitos solúveis comuns em plantas de mandioca como aminoácidos, flavonóides e cianogênios glicosilados como relatado no trabalho de PINTO-ZEVALOS et al (2016).

Figura 1: Perfil dos metabolômico das coloca a figura da OPLS pow!!! duas cultivares de *M. esculenta*



A análise metabolômica também, revelou alguns compostos como ácido láctico, Kaempferol-3-O- rutinosideo, rutina-3-O-rutinosideo, linamarina, ácido clorogênico, treonina, acetona, trigonelina e alanina nas duas

cultivares. Os metabólitos discriminantes para cultivar equador 72, foram a rutina e a Kaempferol. Esses compostos apareceram em ambas as cultivares, porém em maior concentração na cultivar resistente. Ambos são flavonoides que ocorrem em diversas espécies de plantas, possuindo várias atividades, que incluem a proteção contra insetos, patógenos, e radiação ultravioleta, moduladores hormonais, inibidores enzimáticos, antioxidantes e agentes (SOUZA, 2014). A rutina é importante na defesa de plantas contra herbívoros e patógenos, pode ter função diferenciada dependendo dos níveis de concentração, existem relatos de atraso no desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* quando alimentadas com dietas contendo rutina (PINTO-ZEVALOS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2012). Possivelmente, as altas concentrações desses flavonóides podem estar relacionadas à resistência do cultivar equador 72 frente aos insetos-praga *Vatiga illundens* e *Bemisia sp.* da mandioca (BELLOTTI e ARIAS, 2001; CARABALÍ et al., 2010).

Conclusões:

Após as análises de identificação dos metabólitos solúveis o cultivar equador 72 (cultivar resistente) apresentou perfis metabolômicos distintos. Entre esses compostos, foram encontrados os dois compostos discriminantes, rutina e kampfferol, em maiores concentrações na cultivar resistente. A presença desses compostos solúveis em altas concentrações podem estar relacionados a resistência dessa cultivar aos ataques de insetos-praga. Portanto, esses resultados demonstram que a análise do metaboloma pode ser uma poderosa ferramenta para identificação de moléculas envolvidas na defesa de plantas, a ser aplicada adicionalmente a programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Referências bibliográficas

- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura Mensal - Mandioca: Raiz, Farinha e Fécula. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Jan/2017.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Produção mundial de raiz de mandioca no ano de 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acessado em: dez/2017.
- OTSUBO, A. A. et al. Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados, MS, 2002. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38819/1/LV20021.pdf>. Acesso em: 5 de Jan. 2018.
- PIETROWKI et al. Insetos-praga da cultura da mandioca na região centro-sul do Brasil. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2010. Disponível em http://www.unioeste.br/cursos/rondon/agronomia/docs/insetos_praga_da_cultura_da_mandioca.pdf . Acesso em: 10 de Jan. 2018.
- ROBERT, C. A. M. et al. Herbivore-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. *New Phytologist*, v. 194, n. 4, p. 1061-1069, 2012.
- SHIMODA, T. et al. The effect of genetically enriched (E)- β -ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spidermite-induced volatile blends of torenia. *New Phytologist*, v. 193, n. 4, p. 1009-1021, 2012.
- KIM H.K., CHOI Y.H., VERPOORTE R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *nature protocols*. 2010 Mar;5(3):536.
- PRAWAT H. et al. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry* 40, 1167-1173, 1995.
- SOUZA, B. H. S. Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). 2014.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M., PAREJA, M., and AMBROGI, B. G. "Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view." *Phytochemistry* 130 (2016): 10-21.
- RIBEIRO, P. E. A., et al. "Efeito da rutina e do ácido clorogênico sobre a mortalidade e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)." Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba. Anais web. Curitiba: SEB: UFPR, 2012.
- BELLOTTI, A. C.; ARIAS, B. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study.

Crop Protection, v. 20, n. 9, p. 813-823, 2001.

CARABALÍ, A. et al. *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). Crop protection, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2010.