

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA AO NEMATÓIDE *Meloidogyne javanica*.

EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM NEMATODE (*Meloidogyne javanica*) RESISTANT SOYBEAN GENOTYPES

SILVA, J.F.V.¹; KOBAYASHI, A.²; HOFFMANN-CAMPO, C.B.¹; DIAS, W.P.¹; VERONEZZI, G.¹ & LIMA, C.G.¹; ¹Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina-PR; ²Universidade Centro Universitário Filadélfia, CEP 86.020-000, Londrina – PR; e-mail veloso@cnpso.embrapa.br

Resumo

Os nematóides formadores de galhas são um dos principais problemas fitossanitários da soja em regiões tropicais. O desenvolvimento de cultivares de soja resistentes é uma importante ferramenta de controle. Neste trabalho, buscou-se avaliar o papel que as gliceolinas desempenham na resistência, avaliando-se a formação dessas substâncias em genótipos resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne javanica*, inoculados e não inoculados com o nematóide. As substâncias Daidzina, Malonil-daidzina e especialmente Daidzeína foram significativamente observadas no genótipo resistente inoculado com o nematóide.

Palavras-chave: *Glycine max*, gliceolinas, *Meloidogyne javanica*, nematóides, resistência

Introdução

Os nematóides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematóides causadores de galhas, são amplamente disseminados em todo o mundo, especialmente em países de clima tropical. A espécie *Meloidogyne javanica* é mais frequentemente associada a danos na produção de soja em todo o Brasil. O uso de cultivares de soja resistentes é a melhor, mais eficaz e econômica estratégia de controle desses nematóides, sendo que diversos programas de melhoramento buscam o desenvolvimento de cultivares resistentes (Silva et al., 2001a; Silva et al., 2001b). Para acelerar o desenvolvimento de cultivares resistentes, novas e mais eficientes metodologias são desejáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das gliceolinas na resistência de genótipos de soja ao nematóide *M. javanica*. As gliceolinas são compostos fenólicos, pterocarpanos, sinalizadores moleculares de defesa da soja a estresses bióticos, causados, por exemplo, por insetos, nematóides e fungos, e abióticos, causados por deficiência hídrica, raios ultravioletas, entre outros.

Material e métodos

O nematóide *M. javanica* foi multiplicado em soja, cultivar Embrapa 20 (DOKO RC), em vasos mantidos em casa de vegetação, durante 60 dias. Após esse período, as raízes com galhas foram coletadas e trituradas no liquidificador com solução de 0,5% hipoclorito de sódio, por 30 s. A suspensão foi passada por peneiras de 200 mesh sobre a de 500 mesh, sendo os ovos retidos na última peneira colocados em câmara de eclosão, em temperatura de 25°C. A suspensão de juvenis foi recolhida e sua concentração foi determinada em câmara de Petters. Para a realização dos estudos, foram utilizados os genótipos de soja BRS 133, suscetível a *M. javanica*, e PI 595099, resistente. Os genótipos resistente e suscetível foram inoculados com 3.300 juvenis por plântula, em orifício próximo à radícula, com seis repetições de cada tratamento. Uma amostra de cada tratamento foi separada no momento da coleta para coloração com fucsina ácida, para efeito de comprovação do sucesso da inoculação. A coloração das raízes seguiu o método proposto por Byrd et al. (1983). Tratamentos com os mesmos genótipos, resistentes e suscetíveis, não inoculados com o nematóide também foram conduzidos, com cinco repetições para cada tratamento.

Para extração da glicolinas, as coletas das raízes de soja foram realizadas 24, 72, 96 e 196 horas após a inoculação. Também foram coletados os genótipos sem inoculação. As raízes foram cuidadosamente limpas, cortadas em pequenos pedaços e macerados em almofariz, acrescentando-se N₂ líquido. Amostras de 100 mg foram pesadas e após a adição de 1000µL de MeOH (90%), foram centrifugadas (18000 rpm) por 15 minutos e, posteriormente secas em N₂ gasoso. As amostras foram resolubilizadas, adicionando-se, com auxílio de uma pipeta, 1,5µL de 80% de MeOH. O extrato obtido foi filtrado, transferido para tubos de auto-injeção e analisados em Cromatógrafo - Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPCL, marca Shimadzu, modelo Prominence, com controlador CBM – 20A; detetor SPD – 20A; degaseificador DGU 20 – A5 e forno CTO -20A).

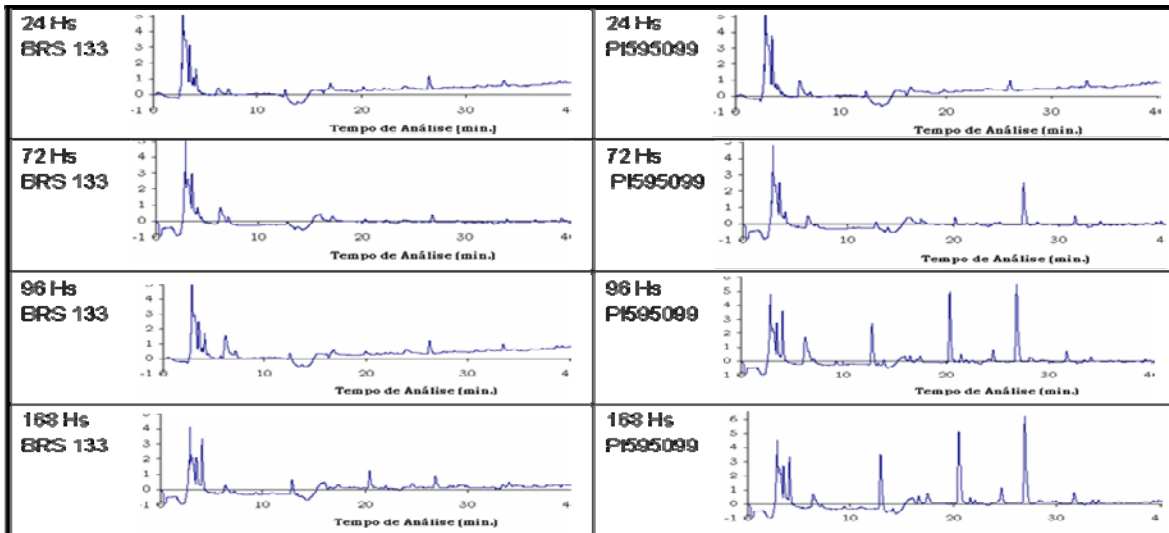


Figura 1. Perfis obtidos em Cromatograma HPLC (Shimadzu Prominence com LC Solution) para os genótipos de soja BRS 133 e PI 595099, respectivamente suscetível e resistente a *M. javanica*, 24, 72, 96 e 168 horas após a inoculação dos juvenis do nematóide.

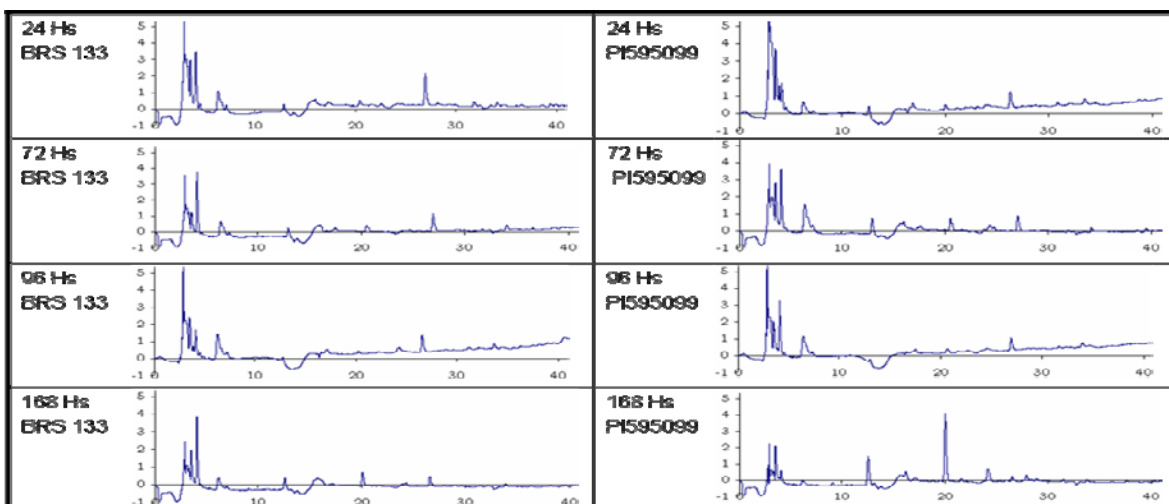


Figura 2. Exemplos de perfis obtidos em Cromatograma HPLC (Shimadzu Prominence com LC Solution) para os genótipos de soja BRS 133 e PI 595099, respectivamente suscetível e resistente a *M. javanica*, não inoculados com juvenis do nematóide.

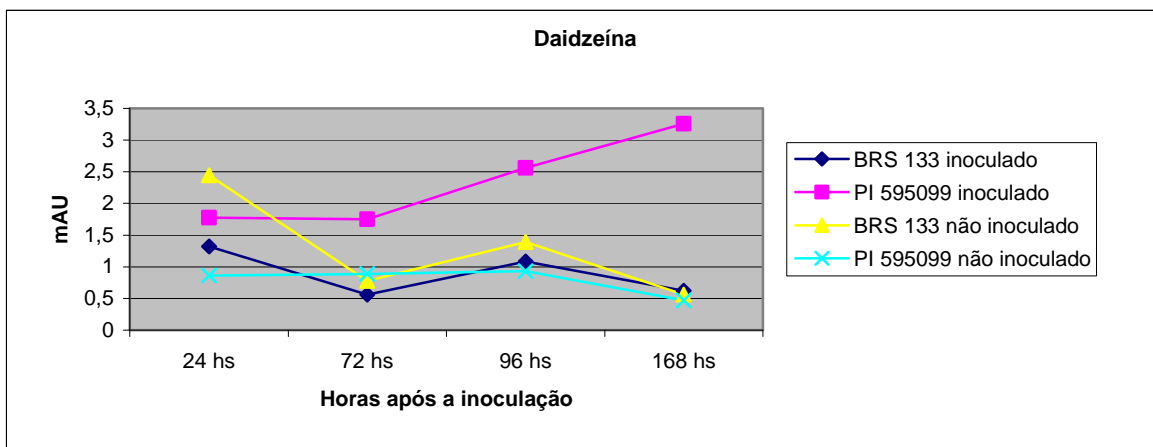


Figura 3. Teores de Daidzeína obtidos em diferentes tempos de coleta (24 hs, 72 hs, 96 hs e 168 hs) em Cromatograma HPLC (Shimadzu Prominence com LC Solution) para os genótipos de soja BRS 133 e PI 595099, respectivamente suscetível e resistente a *M. javanica*, inoculados e não inoculados com juvenis do nematóide.

Resultados e discussão

Nos cromatogramas obtidos no HPLC foi observada no genótipo resistente PI 595099 inoculado a presença das substâncias Daidzina, Malonil-daidzina e Daidzeína, já relatadas como envolvidas na resistência de genótipos de soja a nematóides do gênero *Meloidogyne* (CARPENTIERI-PIPOLO et al., 2004), com picos de retenção respectivamente de 12,93 min, 20,55 min e 26,94 minutos. Estas substâncias, especialmente a Daidzeína, não foram significativamente observadas no genótipo suscetível inoculado BRS 133, nos mesmos períodos de coleta (Figura 1). Os mesmos genótipos, quando não inoculados com o nematóide também não apresentaram as substâncias mencionadas, especialmente a Daidzeína (Figura 2). Na Figura 3 é mostrado a acumulação da Daidzeína no genótipo PI 595099 após a inoculação com *M. javanica*.

Como compostos conjugados da daidzeína estão envolvidos na rota metabólica das glicolinas (pterocarpanos), estudos envolvendo coleta de raízes de soja em datas adicionais deverão ser realizados, quando provavelmente será possível a observação da ocorrência destes pterocarpanos.

Referências

- BYRD, JR. D.W.; KIRKPATRICK, J.E. & BARKER, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15 (1): 142-143.
- CARPENTIERI-PIPOLO, V ; MANDARINO, José Marcos Gontijo ; PANIZZI, Mercedes Concórdia Carrão ; SOUZA, Agnelo . Association of isoflavonoids with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. In: VII World soybean Research conference, 2004, Foz do Iguaçu. *Proceedings of VII World soybean Research conference, 2004*. p. 166-166.
- FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginose da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J.F.V. (Org.). **Relações parasito - hospedeiro nas meloidoginose da soja**. Londrina: EMBRAPA - Soja, 2001. p.15-38.
- SILVA, J.F.V.; FERRAZ, L.C.C.B.; ARIAS, C.A. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**, v.31, n.2, p.211-219, 2001.



SILVA, J.F.V.; FERRAZ, L.C.C.B.; ARIAS, C.A.; ABDELNOOR, R. V. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites associados à resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n.1, p.79-83, 2001.