

Estudo cinético das concentrações de rutina e de ácido clorogênico em folhas de quatro genótipos de milho infestadas com larvas de *Spodoptera frugiperda*

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro⁽¹⁾; Paulo Afonso Viana⁽²⁾; Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães⁽²⁾; Fabiano Okumura⁽³⁾; Jacqueline Aparecida Takahashi⁽⁴⁾; João Paulo Dale Costa e Silva⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; paulo.eduardo@embrapa.br; ⁽²⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Analista; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Professora e Pesquisadora; Universidade Federal de Minas Gerais; ⁽⁵⁾ Estudante; Universidade Federal de São João del-Rei.

RESUMO: A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é a principal praga do milho. Dentre as diversas abordagens para lidar com esse fitófago, a identificação dos fatores químicos de resistência natural encontrada em alguns genótipos resultantes de melhoramento genético é de grande importância para o desenvolvimento de cultivares resistentes adaptadas às condições tropicais. O objetivo desse trabalho foi realizar o acompanhamento cinético da concentração de duas substâncias possivelmente associadas à resistência do milho a essa praga, como forma de elucidar um desses mecanismos de defesa. As concentrações de rutina e de ácido clorogênico foram acompanhadas por sete dias, demonstrando que, nos genótipos considerados resistentes a *S. frugiperda*, houve aumento na concentração dessas substâncias, indicando que possivelmente tratam-se de substâncias associadas à defesa induzida do milho.

Termos de indexação: comunicação planta-planta, defesa induzida, resistência a pragas.

INTRODUÇÃO

O milho possui mecanismos constitutivos de defesa, que se utilizam de compostos químicos provenientes de metabolismo secundário para afetar a sobrevivência e o comportamento de insetos-pragas, seja por toxicidade, detergência ou mesmo repelência. Esses compostos são sintetizados, acumulados e estocados pela planta nos diferentes estágios de seu desenvolvimento (MALVAR et al., 2008).

A lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) é a principal praga do milho no Brasil. A identificação de resistência natural de genótipos de

milho e de outros hospedeiros é, portanto, uma das abordagens promissoras para enfrentamento dessa praga. Machado et al. (2014) identificaram a presença de duas substâncias em genótipos de milho considerados mais resistentes à *S. frugiperda*: a rutina, um flavonoide glicosídico, e o ácido clorogênico, um ácido fenólico. Entretanto, não foi possível determinar se esses compostos são constitutivos e têm ação direta sobre a praga ou se apresentam-se como precursores em um processo de defesa induzida.

O objetivo desse trabalho foi determinar a variação das concentrações das substâncias rutina e ácido clorogênico nas folhas de genótipos de milho após infestação com *S. frugiperda* e, com isso, auxiliar na compreensão de seus papéis na resistência natural de milho a essa praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro genótipos de milho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo para avaliação da concentração de rutina e ácido clorogênico nas folhas, sendo dois considerados resistentes a *S. frugiperda* (Zapalote Chico - ZC e Sintético Spodoptera - SS), um considerado intermediário (L3) e um considerado susceptível (BRS 4103). Foram plantadas em casa de vegetação oito sementes por vaso, com desbaste antes das coletas para cinco plantas por vaso de cinco litros. A disposição dos vasos foi em blocos ao acaso, entretanto os diferentes vasos do mesmo genótipo não foram usados como repetições, mas para formação de uma amostra composta com massa suficiente para realizar as extrações.

Quando as plantas estavam em estágio V4, foram

coletadas as segundas folhas das plantas de cada genótipo. Foi pesado com precisão 1 grama de cada amostra, triturada em nitrogênio líquido e extraída com 3 x 5 mL de etanol 70%. Os extratos foram transferidos para tubos tipo Falcon de 50 mL e o volume foi completado para 20 mL. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C para análise posterior (adaptado de AN et al., 2013).

Ainda no estágio V4, metade das plantas de cada genótipo foi infestada com 10 larvas neonatas de *S. frugiperda* por planta. Foram realizadas coletas e extrações de folhas de plantas infestadas e não infestadas de cada genótipo após 1, 2, 4 e 7 dias de infestação, utilizando o mesmo procedimento descrito acima.

As amostras foram analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas (Thermo TSQ Access Max) para determinar a concentração de rutina e de ácido clorogênico em cada amostra. As transições m/z utilizadas para quantificação de rutina foram 609>585,69, 609>267,97 e 609>239,90 e para o ácido clorogênico 353>325,65, 353>146,47 e 353>126,81 (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações iniciais de rutina na folha, antes da infestação das plantas com as larvas de *S. frugiperda*, variaram de 248,4 a 675,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$. O monitoramento dessa concentração nos quatro genótipos após a infestação mostra uma tendência de aumento da concentração de rutina um dia após a infestação para os genótipos L3 e ZC, enquanto SS permaneceu estável e BRS 4103 apresentou redução (Figura 1). No segundo dia após a infestação, a concentração de rutina permaneceu em queda nas folhas do genótipo BRS 4103, reduziu em L3 e ZC, enquanto SS apresentou aumento na concentração de rutina. Esse comportamento nos primeiros dias após a infestação sugere que a rutina possa estar relacionada com as características de resistência de ZC e de SS, entretanto a segunda com uma resposta um pouco tardia. Do quarto dia após a infestação em diante, BRS 4103 apresenta uma reação ainda mais tardia, com aumento da concentração de rutina, podendo-se associar essa demora na resposta, quando comparado com os outros genótipos, a sua susceptibilidade a *S. frugiperda*.

A comparação da resposta dos genótipos infestados com seus respectivos controles (planta não

infestada) revela ainda uma possível evidência de comunicação planta-planta em alguns genótipos. Analisando a Figura 2, é possível verificar que, mesmo não tendo sido infestadas, as plantas de ZC apresentaram um aumento na concentração de rutina dois dias após a infestação das outras plantas do experimento, que se encontravam na mesma casa de vegetação, portanto, com um dia de diferença em relação às plantas infestadas do mesmo genótipo. Erb et al. (2015) demonstraram que algumas horas após a infestação de plantas de milho com *Spodoptera littoralis* ocorre liberação do composto volátil indol, capaz de induzir plantas vizinhas a se preparar para possíveis ataques.

Algo semelhante foi observado para o outro genótipo resistente, SS, cujas plantas não infestadas apresentaram o mesmo aumento na concentração das plantas infestadas, mostrando uma provável resposta via comunicação planta-planta que seria tão eficiente, no caso desse genótipo, quanto a resposta à injúria causada diretamente pela larva de *S. frugiperda* (Figura 3).

Avaliando a cinética da concentração de ácido clorogênico, verifica-se que, nos dois primeiros dias após a infestação, L3 e ZC apresentaram valores estáveis, enquanto BRS 4103 apresentou redução e SS aumento (Figura 4). Ao final dos 7 dias de avaliação, todos os genótipos apresentaram concentrações desse composto acima das concentrações iniciais antes da infestação, com um destaque para L3, que apresentou uma resposta bastante tardia, apenas após 7 dias, mas registrou um aumento de 40 vezes em relação à concentração inicial, antes da infestação. Isso pode explicar o fato de L3 ser um genótipo de resistência intermediária a *S. frugiperda*.

Na comparação com o controle, merece destaque a variação da concentração de ácido clorogênico do genótipo ZC. Apesar de não ter se destacado entre os outros genótipos, quando se comparam as plantas infestadas com as não infestadas desse genótipo verifica-se que, enquanto nas plantas não infestadas o ácido clorogênico não foi detectado a partir do segundo dia, nas plantas infestadas ele apresentou aumento crescente na concentração até o final do experimento (Figura 5). Seguindo o raciocínio anterior, o ácido clorogênico não seria uma substância induzida pela comunicação planta-planta.

CONCLUSÕES

Há indícios de que tanto a rutina quanto o ácido clorogênico são substâncias cuja biossíntese nas

folhas de milho resistentes a *S. frugiperda* é aumentada pela infestação por larvas desse fitófago, podendo estar associada aos mecanismos de resistência natural de determinados genótipos.

O aumento da concentração de rutina na folha em genótipos resistentes que não foram infestados sugere a existência de um mecanismo de comunicação planta-planta, como preparação de resposta para um possível ataque desse fitófago. Essa observação precisa ser confirmada em experimentos com isolamento entre as plantas infestadas e não infestadas, para avaliar se o aumento observado realmente é decorrente desse mecanismo ou se ocorreria de qualquer maneira devido ao desenvolvimento fisiológico das plantas desses genótipos, o que caracterizaria uma defesa constitutiva e não induzida.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa pelo apoio na realização das atividades.

REFERÊNCIAS

AN, H.; WANG, H.; LAN, Y.; HASHI, Y.; CHEN, S. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of

phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MS and HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, n. 85, p. 295-304, 2013.

ERB, M.; VEYRAT, N.; ROBERT, C. A. M.; XU, H. FREY, M.; TON, J.; TURLINGS, T. C. J. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. **Nature Communications**, New York, v. 6, n. 6273, p. 1-10, 2015.

MACHADO, Y.; TAKAHASHI, J. A.; VIANA, P. A.; RIBEIRO, P. E. A.; GUIMARAES, P. E. O. Chemical response of maize plants to fall armyworm feeding damage. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 13, n. 3, p. 249-260, 2014.

MALVAR, R. A.; BUTRÓN, A.; ORDÁS, B.; SANTIAGO, R. Causes of natural resistance to stem borers in maize In: BURTON, E. N.; WILLIAMS, P. V. (Ed.). **Crop protection research advances**. New York: Nova Science Publishers, 2008. p. 51-96.

TORRAS-CLAVERIA, L.; JÁUREGUI, O.; CODINA, C.; TIBURCIO, A. F.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**, Limerick, n. 182, p. 71-78, 2012.

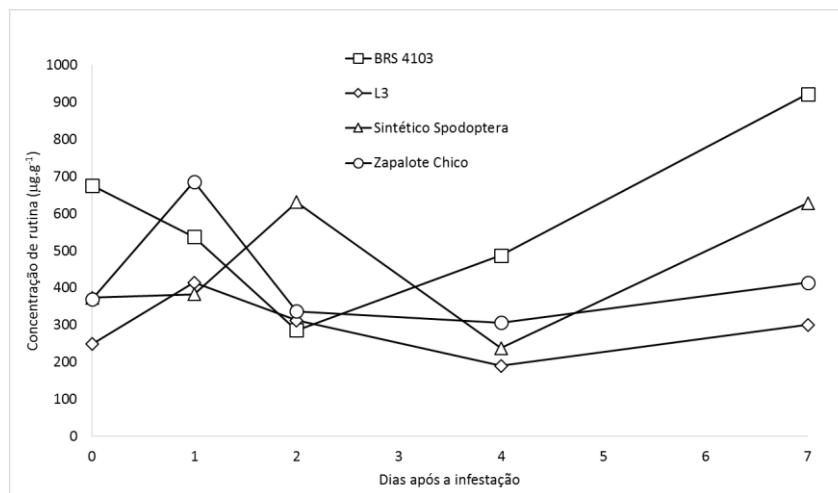


Figura 1 – Concentração de rutina em plantas de milho infestadas com larvas de *S. frugiperda*.

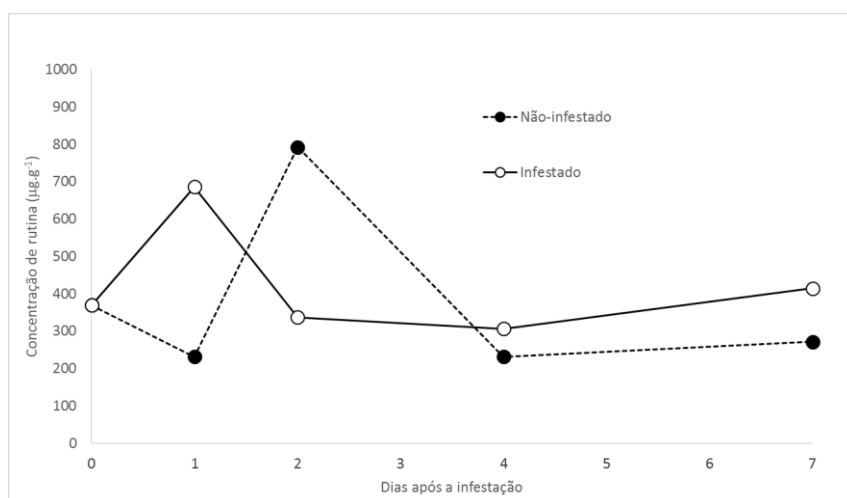


Figura 2 – Concentração de rutina em folhas de milho do genótipo Zapalote Chico infestado e não infestado.

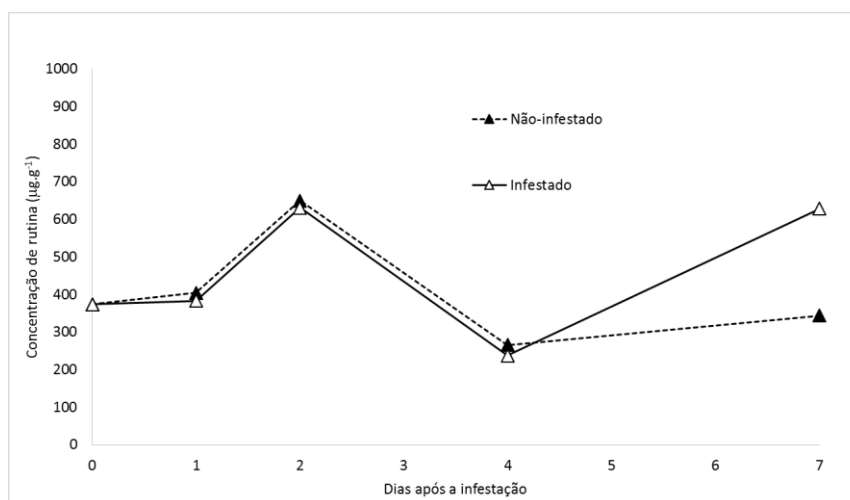


Figura 3 – Concentração de rutina em folhas de milho do genótipo Sintético Spodoptera infestado e não infestado.

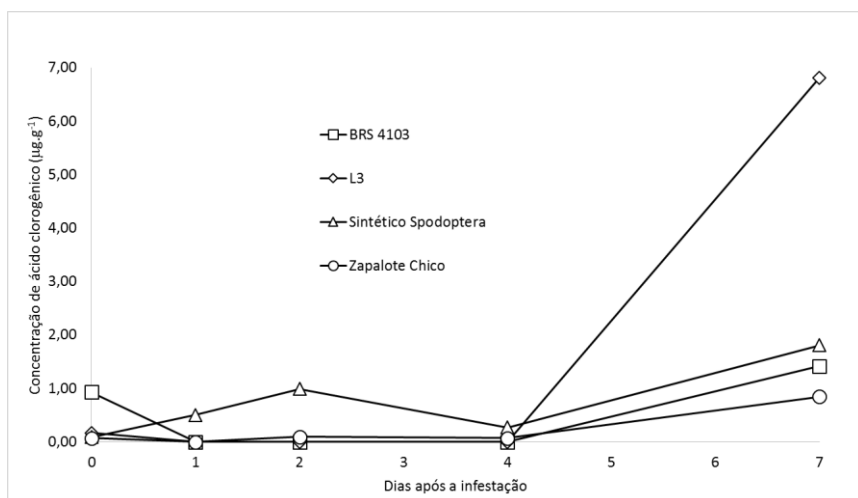


Figura 4 – Concentração de ácido clorogênico em plantas de milho infestadas com larvas de *S. frugiperda*.

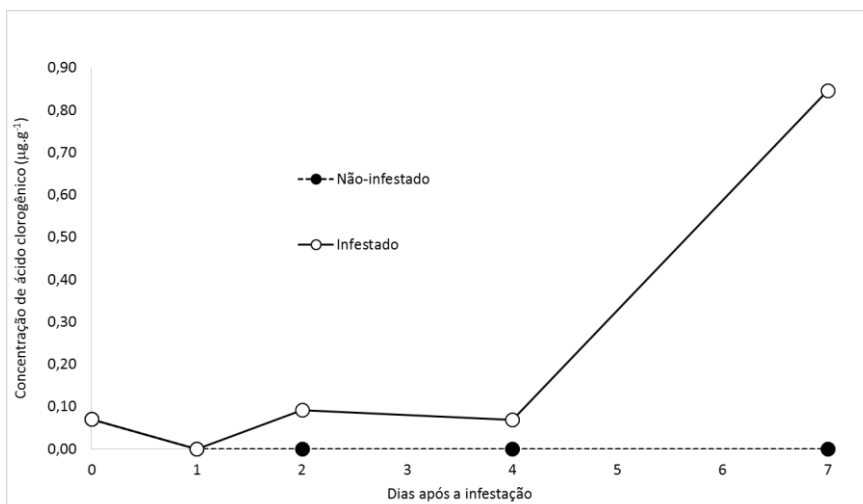


Figura 5 – Concentração de ácido clorogênico em folhas de milho do genótipo Zapalote Chico infestado e não infestado.