

ESTUDO METABOLÔMICO DA DOENÇA DA “SOJA LOUCA II” POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Amanda Francisca do Prado Rosolen (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Eduardo Jorge Pilau (Orientador), e-mail: amanda.rosolen@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA / QUÍMICA

Palavras-chave: metabólito, nematoide, metabolômica

Resumo:

A soja é a principal cultura do agronegócio brasileiro. Causada pela infecção pelo nematoide *Aphelenchoides besseyi*, a doença Soja Louca II tem se destacado devido às perdas expressivas que causa sobre a produção. Para compreender como o nematoide atua sobre a planta e identificar metabólitos importantes desta interação, foi utilizada a abordagem metabolômica utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e a ferramenta *molecular networking*. Do total de 557 entidades químicas detectadas na raiz, 15 foram identificadas, e do total de 792 entidades químicas detectadas na folha, 8 foram identificadas, sendo todos compostos importantes, tais como flavonoides que apresentam influência em diferentes estágios do ciclo de vida de nematoides.

Introdução

A soja (*Glycine max*) é uma cultura de grande importância para o Brasil que é o principal exportador e tornou-se o principal produtor após superar a produção dos Estados Unidos na última safra (2019/2020). Apesar da expressiva produtividade brasileira, as mais de 40 pragas e doenças vinculadas a soja tem causado grandes prejuízos (USDA,2020).

Dentre estas, a Soja Louca II, vem se destacando por causar perdas de até 60% na produção, e a ausência de conhecimento sobre sua etiologia e formas de controle, prejudicando o manejo adequado (RANULFI *et al.*, 2018). Meyer e Favoreto confirmaram por meio de análises morfológicas e moleculares que o agente causador da Soja Louca II é o nematoide *Aphelenchoides besseyi* (FAVORETO, 2017).

Na lavoura a identificação da doença é realizada através de inspeção visual das plantas (RANULFI *et al.*, 2018). Entretanto, os sintomas da infecção só são visualmente perceptíveis ao final do ciclo de produção da soja, o que dificulta a prevenção e manejo da doença. Estes fatores ressaltam a

importância de estudos para um maior entendimento entre a relação nematoide *A. besseyi* e soja (FAVORETO, 2017).

Dentre as ferramentas disponíveis a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas vem sendo amplamente aplicada em análises metabômicas por permitir a identificação, caracterização estrutural e quantificação de metabólitos (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015).

Materiais e métodos

Foram recolhidos folhas e raízes das amostras inoculadas e controle, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e foram maceradas em gral com auxílio de pistilo. Para cada amostra, foram retirados dois microtubos estéreis contendo 100 mg do material vegetal homogeneizado cada, que por sua vez foram incorporados a uma solução extratora composta por Clorofórmio, Metanol e Água, 3:1:1 (v/v/v).

Os microtubos sofreram agitação em vórtex por 10 s e posteriormente a ultrassom com banho de gelo por 20 minutos. Então, as amostras foram filtradas em filtro de seringa e o extrato resultante foi submetido à fluxo de nitrogênio até evaporação do solvente. Após, as amostras foram ressuspensas em Acetonitrila e Água 1:1 (v/v) para serem transferidas para vials de 1 mL para análise em UHPLC-MS/MS.

Resultados e Discussão

Os extratos de raiz e folhas foram analisados por UHPLC-MS/MS e, a partir dos espectros obtidos, foram construídas redes moleculares independentes através da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social*) utilizando a ferramenta *Molecular Networking*, que permite visualizar de forma abrangente o conjunto de dados e anotar metabólitos. Foram detectadas 557 entidades químicas nos extratos das raízes, das quais 15 foram identificados a partir de bibliotecas colaborativas. Nos extratos das folhas 792 entidades químicas foram detectadas, sendo 8 identificadas. Alguns metabólitos identificados nos extratos das raízes e folhas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1– Metabólitos identificados nos extratos da raiz inoculada.

Nome do Composto	Formula Molecular	Massa experimental	Massa teórica	Erro (ppm)
Coumestrol	C ₁₅ H ₈ O ₅	269,044	269,044	3,345
6,7,4'-Trihydroxyisoflavone	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,060	271,06	1,47
Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,060	271,06	1,47
Diadzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255,065	255,065	3,528
Daidzein 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255,065	255,065	3,528

7,3',4'-Trihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_5$	271,060	271,06	1,475
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	$C_{22}H_{42}O_4$	371,314	371,315	-2,42
Dibutyl adipate	$C_{14}H_{26}O_4$	259,19	259,19	0
Asp-Leu	$C_{10}H_{18}N_2O_5$	247,1287	247,128	2,83
Azelaic acid	$C_9H_{16}O_4$	189,1126	189,112	3,172
	$C_9H_{14}O_3$	171,102	171,101	5,84
2-[3,4-bis[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]phenyl]-5,7-dihydroxychromen-4-one	$C_{27}H_{30}O_{16}$	628,1934	628,187	10,18
Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	213,1487	213,148	3,284
Methyl [2-({[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy)methyl]phenyl]methoxy carbamate	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	410,0869	410,087	-0,243
Glycerol 1-myristate	$C_{17}H_{34}O_4$	627,4798	627,48	-0,318
Diphenylphosphate Diphenyl hydrogen phosphate	$C_{12}H_{11}O_4P_1$	251,0465	251,046	1,991

Tabela 2- Metabólitos identificados nos extratos da folha inoculada.

Nome do Composto	Formula Molecular	Massa experimental	Massa teórica	Erro (ppm)
Leu-Val	$C_{11}H_{22}N_2O_3$	231,170	231,170	0
Leu-Leu	$C_{12}H_{24}N_2O_3$	245,186	245,186	0
Daidzin	$C_{21}H_{20}O_9$	417,117	417,118	-2,39
Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433,112	433,112	-2,07
Phthalic anhydride	$C_8H_4O_3$	149,023	149,023	-2,01
Dibutyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	279,158	279,159	-3,58
13-Docosenamide, (Z)	$C_{22}H_{43}NO$	338,342	338,341	0,886

Todos os compostos identificados são de grande importância na proteção da folha e da raiz, tais como o Coumestrol, identificado na raiz inoculada, apresenta atividade inibitória da motilidade de nematoides, enquanto o composto Daidzeína é um composto natural encontrado exclusivamente na soja e é pertencente a uma classe de compostos conhecida como isoflavonas, que são usadas como portadores de sinais e respostas de defesa a ataques patogênicos.

Conclusões

Os mapas químicos gerados a partir dos espectros dos extratos de raízes e de folhas forneceram informações importantes sobre a distribuição dos íons associados a plantas controle e inoculadas. Foram identificados compostos

que apresentam ação nematocida, o que demonstra a habilidade que as plantas de soja têm em modular seu metabolismo para produzir e aumentar a presença de substâncias protetivas. Assim, a abordagem apresentada neste trabalho mostra-se eficiente para o estudo da interação entre o nematoide *Aphelenchoides besseyi* e plantas de soja, podendo contribuir para o entendimento da doença Soja Louca II.

Agradecimentos

Agradeço ao meu professor orientador Eduardo Jorge Pilau, a minha colega e amiga Luiza, ao laboratório Labiomass, Comcap, a Uem e ao CNPQ pelo fomento.

Referências

ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. March, p. 1–20, 2015.

FAVORETO, L. *et al.* Soja louca II - Primeiro estudo da relação patógeno hospedeiro Uberlândia 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2017.

RANULFI, A.C. *et al.* Nutritional characterization of healthy and *Aphelenchoides besseyi* infected soybean leaves by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Microchemical Journal**, v. 141, n. May, p. 118–126, 2018.

USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Disponível em <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/wasde0720.pdf>> . Acesso em 10 jul.2020.