



## SOJA RESISTENTE À FERRUGEM: PARTICIPAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NAS RESPOSTAS DE DEFESA?

SOYBEAN RESISTANT TO RUST:  
INVOLVEMENT OF VOLATILES IN DEFENSE RESPONSES?

BARACAT-PEREIRA, M.C.<sup>1,\*</sup>; ALMEIDA-SOUZA, H.O.<sup>2</sup>; BARBOSA, M.O.<sup>1</sup>; MARQUES, A.E.<sup>1</sup>; PEREIRA, T.H.A.<sup>1</sup>; MAGALHÃES JR., M.J.<sup>1</sup>; TESSAROLLO, N.G.<sup>1</sup>; GAMES, P.D.<sup>1</sup>; BARROS, E.G.<sup>1</sup>; STOLF-MOREIRA, R.<sup>3</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>3</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>3</sup>; PEREIRA, P.R.G.<sup>2</sup>. E-mail: [baracat@ufv.br](mailto:baracat@ufv.br)

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

<sup>2</sup> Bolsista Doutorado CAPES, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

<sup>3</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil;

### Resumo

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é uma grande ameaça à sojicultura brasileira. A avaliação das atividades de enzimas marcadoras de indução de resistência pode auxiliar na elucidação de mecanismos envolvidos em respostas de defesa das plantas. Proteína total e atividades de enzimas marcadoras da indução de resistência foram determinadas em extratos de folhas de plantas dos genótipos PI561356 (resistente, PI) e Embrapa 48 (susceptível, E48), inoculadas ou não com *P. pachyrhizi*. Respostas muito discrepantes entre os dois genótipos e entre os tempos de coleta (12, 72 e 168 h após inoculação) foram observadas, em especial para lipoxigenases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Diferentemente de E48, plantas de PI responderam tardiamente à inoculação pelo fungo com a redução da concentração da proteína total e de atividades enzimáticas. Os dados indicam que as vias que envolvem ação dessas duas enzimas devem participar ativamente da defesa das plantas de soja de E48, mas não de PI. Uma hipótese para explicar a resistência de PI é que voláteis produzidos por plantas inoculadas atuam como moduladores da resposta de defesa.

### Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, com 49% da área plantada do país (MAPA, 2011). A ferrugem asiática da soja (FAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi*, promove a desfolha precoce e compromete vagens e grãos (Godoy et al., 2009). Desde 2008, pesquisadores brasileiros membros do Consórcio Internacional do Genoma da Soja buscam identificar genes envolvidos nas respostas a estresses. Plantas respondem a estresses abióticos ou bióticos por mecanismos pré-existentes e/ou induzidos. Pode haver a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR) por infecções ou agentes químicos ou ambientais (Seo et al., 2008). Alterações nas atividades de enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (Silva et al., 2004; Macagnan et al., 2008). Dentre essas enzimas estão as lipoxigenases (LOX) e as beta-1,3-glucanases (Baysal et al., 2003). As LOX (EC 1.13.11.12) catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, originando compostos voláteis e o regulador traumatina, dentre outros, envolvidos em crescimento, maturação, senescência e respostas de defesa das plantas (Baysal & Demirdoven, 2007). As beta-1,3 glucanases (EC 3.2.1.6) hidrolisam  $\beta$ -1,3-glucanas das paredes celulares e esporos de fungos (Wu & Bradford, 2003). Em plantas, as  $\beta$ -1,3 glucanases são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresses (Wu & Bradford, 2003). Para o patossistema soja-*P. pachyrhizi*, pouco se conhece sobre os mecanismos de defesa das plantas. Este trabalho visou avaliar as respostas de defesa após inoculação de plantas de dois genótipos de soja, PI 561356, resistente à FAS, e Embrapa 48, susceptível, por meio da avaliação das atividades de cinco enzimas de indução de resistência, incluindo as LOX e as  $\beta$ -1,3-glucanases, reconhecidas como representativas do estado de defesa das plantas a patógenos.

## Material e Métodos

**Material biológico** – Foi utilizada uma população de campo de *Phakopsora pachyrhizi*, coletada em lavouras de soja no estado do Mato Grosso, mantida por mais de 10 gerações no cv. BRSMS-Bacuri (suscetível) por pesquisadores da Embrapa Soja - CNPSo, Londrina-PR. Sementes de soja da PI 561356 (resistente, PI) e Embrapa 48 (susceptível, E48) foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG/CNPSo). PI carrega o gene *Rpp1* de resistência à FAS já mapeado no genoma da soja. Após germinação, plântulas de ambos os genótipos foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram sob luz incandescente por 10 dias. Foram utilizados delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por três vasos com duas plantas por vaso. Plantas com 27 dias, no estágio V2, foram inoculadas com esporos do fungo *P. pachyrhizi* por pulverização com uma suspensão ajustada para  $1,4 \times 10^5$  uredósporos/mL e mantidas isoladamente em câmara úmida por um dia após a inoculação. Todas as folhas das plantas foram coletadas em 12, 72 ou 168 horas após inoculação (h.a.i.). A inoculação foi simulada em plantas-controle, com o mesmo procedimento na ausência de esporos. As folhas foram congeladas (nitrogênio líquido) e mantidas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  até o preparo de extratos proteicos.

**Preparo dos extratos vegetais** - Para a determinação de proteína total e das atividades das enzimas, 5 g de folhas de soja PI e E48 congeladas, de cada tempo de coleta, e os respectivos controles, foram separadamente pulverizadas em nitrogênio líquido. O pó obtido foi macerado com polivinilpirrolidona (PVPP) 2% e Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, (1:3, g:mL), acrescido de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e benzamidina a 1 mM cada. Cada extrato foi centrifugado a 20.100 g,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , por 25 min, e os sobrenadantes utilizados nas determinações.

**Determinação da proteína total** - A quantificação protéica foi por Bradford (1976), ajustado para micro-quantidades pelo nosso grupo (dados não apresentados). A proteína-padrão foi a BSA (0 a 60  $\mu\text{g}$ ,  $y=0,0865x+0,0843$ ,  $R^2=0,9928$ ).

**Atividade de Lipoxigenases (LOX) e de  $\beta$ -1,3-Glucanases** - As LOX (Axelrod et al., 1981) foram avaliadas pela  $\Delta A_{234}$  em linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0 (substrato), em reação constituída de 1000  $\mu\text{L}$  de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20  $\mu\text{L}$  do substrato e 10  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) dos hidroperóxidos para o ácido linoléico foi  $25.000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . A atividade das LOX foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido do ácido linoléico formado. $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ . As beta-1,3-glucanases foram determinadas pela  $\Delta A_{410}$  sob laminarina, usando hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura de reação, contendo 220  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250  $\mu\text{L}$  de substrato (laminarina 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 30  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal, foi incubada a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h. Em seguida, foi acrescentado 1,5 mL de solução de desenvolvimento de cor (0,5 g da HAPHB em 10 mL de HCl 0,5 M e de 50 mL de NaOH 0,5 M), a mistura foi aquecida ( $100\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min), resfriada em gelo até  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , e a  $A_{410}$  foi determinada. O controle correspondeu à mistura sem incubação. Os resultados foram expressos em unidades de  $\Delta A_{410}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}$  proteína $^{-1}$ . Todos os ensaios foram em triplicata. Os valores médios das observações foram ajustados a equações de regressão com maior  $R^2$  para obter as tendências de resposta das características em função do tempo.

## Resultados e Discussão

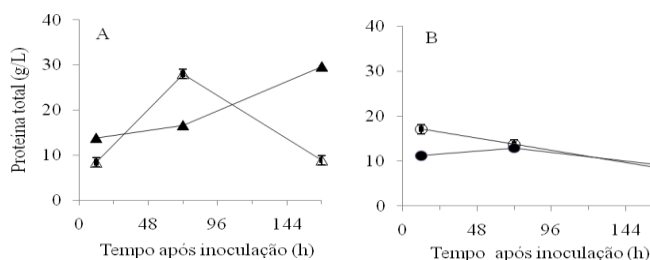
A proteína total e as atividades das enzimas de defesa avaliadas variaram entre PI e E48 nos diferentes tempos após inoculação do patógeno. Os padrões de resposta de defesa de E48 (susceptível) em plantas inoculadas e não inoculadas, são semelhantes aos observados em outros patossistemas descritos, o que não foi observado para PI (resistente).

**Proteína total:** Para E48, a proteína total ao longo de 168 h.a.i. apresentou tendência a um ajuste exponencial positivo e crescente ( $y=12,439e^{0,005x}$ ,  $R^2=0,9756$ ), indicando que aumentos na síntese de proteínas podem auxiliar no processo de defesa. De forma diferente, plantas do genótipo PI apresentaram baixa variação na concentração protéica, com decréscimo na proteína total após 72 h.a.i. ( $y=-0,0004x^2+0,0652x+10,482$ ,  $R^2=1$ ) (Figura 1), indicando que a defesa em PI não depende da síntese de novo de proteínas.

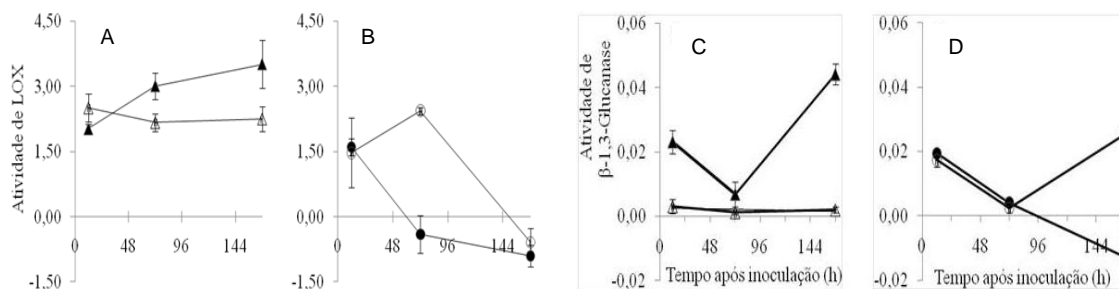
**LOX:** A inoculação promoveu aumento das LOXs em E48 ao longo do tempo, com tendência a um ajuste logarítmico positivo ( $y=0,5616\cdot\ln(x)+0,6208$ ,  $R^2=0,9997$ ). De forma inversa, as atividades de LOX na PI decresceram nas 168 h.a.i. nas plantas inoculadas ( $y=-$

$0,977\ln(x)+3,9681$ ,  $R^2=0,9832$ ) (Figura 2B), sugerindo desativação da via das LOX que atuam em torno de pH 6,0. As plantas de PI não inoculadas apresentaram padrão semelhante ao das inoculadas, sugerindo que essa resposta pode ser devida à presença de voláteis produzidos pelas plantas inoculadas. Há relatos que corroboram essa sugestão: Liavonchanka & Feussner (2006) descreveram diversos voláteis de plantas, incluindo-se alcoóis, éteres e aldeídos de folhas, como compostos de sinalização para a defesa de plantas; Porta & Rocha-Sosa (2002) apontaram diferentes voláteis produzidos por folhas de plantas infectadas ou feridas, relatando que plantas vizinhas podem identificar esses estímulos e responder de forma diferenciada para sua defesa. Estudos transcriptômicos de plantas de soja do genótipo PI 200492 inoculadas com *P. pachyrhizi* corroboram os resultados de E48, mas não os de PI, pois mostraram aumentos da expressão de LOX entre 1 e 48 h.a.i. (Choi et al., 2008).

**Beta-1,3-glucanases:** As maiores atividades de beta-1,3-glucanases em E48 (Figura 2C) foram em 12 e 168 h.a.i., quando comparadas com os controles, o que sugere resposta ao fungo (inicial e transiente) em 12 h.a.i. frente ao desafio, e resposta tardia a compostos voláteis ou metabólitos em 168 h.a.i. Para a PI, as atividades de beta-1,3-glucanases em função do tempo foram maiores apenas no controle para 168 h.a.i. (Figura 2D). Estudos mostraram que a superexpressão de genes para glucanases em plantas aumenta a resistência a patógenos (van Loon et al., 2006). A infecção de plântulas de soja por *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* aumentou a síntese e o acúmulo de  $\beta$ -1,3-glucanase (Yi & Hwang, 1996).



**Figura 1.** Proteína total dos extratos de folhas de soja Embrapa 48 (E48, A) e PI561356 (PI, B) após inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*. As folhas das plantas inoculadas (símbolos cheios) e dos controles (símbolos vazios) foram coletadas em 12, 72 e 168 h.a.i. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 2 -** Atividade específica de LOX (A e B) e de beta-1,3-glucanases (C e D) de soja Embrapa 48 (A e C) e PI 561356 (PI - B e D) após inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*. As folhas das plantas dos tratamentos (símbolos cheios) e dos controles (símbolos vazios) foram coletadas em 12, 72 e 168 h.a.i. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados de E48 corroboram o comumente relatado pela literatura, quando a indução de resistência envolve a ativação de genes que codificam um conjunto de enzimas PR (Resende et al., 2002). Para PI, em que os resultados não estão de acordo com os de E48, uma hipótese para a redução das atividades de LOX e beta-1,3-glucanases em plantas inoculadas e não inoculadas pode estar relacionada à sinalização por voláteis produzidos pelas plantas

inoculadas, já que as plantas foram cultivadas no mesmo ambiente em casa-de-vegetação. Compostos voláteis são descritos como sinais de defesa reconhecidos por receptores de membranas, e que podem desencadear respostas por meio de amplificação de sinais. Embora nenhum estudo tenha sido localizado especificamente para esse patossistema ou outro similar, vale relatar que estudos de infecção por *Ralstonia solanacearum* em tomate observaram que o silenciamento de proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPKs), que participam em cascatas de respostas, promoveu aumento significativo na proliferação bacteriana e doença, confirmando o envolvimento da quinase na cascata de resposta (Yong-Yi et al., 2009). Mecanismos de amplificação de respostas por sinais voláteis requerem possivelmente baixas concentrações protéicas.

### Conclusões

- As atividades de LOX e de beta-1,3-glucanases não explicam eventos de resistência diferentes apresentados por PI 561356 (resistente à FAS) e Embrapa 48 (susceptível);
- Mecanismos de amplificação de respostas por sinais voláteis podem estar envolvidos na resposta de resistência de PI 561356 à ferrugem.

**Agradecimentos:** CNPq (GenoSoja, PIBIC e PQ); FAPEMIG (projetos); FINEP (CT-Infra); CAPES (Bolsa PNPd) e NuBioMol/UFV (parceria em pesquisa).

### Referências

- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis*. **Plant Pathology**, v.52, p.747-753, 2003.
- BAYSAL, T.; DEMIRDOVEN, A. Lipoxigenase in fruits and vegetables: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.491-496, 2007.
- CHOI, J.J.; Alkharouf, N.W.; Schneider, K.T.; Matthews, B.F.; Frederick, R.D. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxigenases. **Functional and Integrative Genomics**, v.8, p.341-59, 2008.
- GODOY, C.V.; FLAUSINO, A.M.; SANTOS, L.C.M.; DEL PONTE, E.M. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.56-61, 2009.
- LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxigenases: occurrence, functions and catalysis. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.348-57, 2006.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 34-37, 2008.
- PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxigenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**, v.130, p.15-21, 2002.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C. P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621-628, 2002.
- SEO, P.J.; LEE, A.K.; XIANG, F., PARK, C.M. Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. **Plant and Cell Physiology**, v.49, p.334-344, 2008.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.D.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.
- van LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135-162, 2006.
- WU, C.T.; BRADFORD, K.J. Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, v.133, p.263-273, 2003.
- YI, S.Y.; HWANG, B.K. Differential induction and accumulation of beta-1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* f sp *glycinea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48, p.179-192, 1996.