

Estudos preliminares relacionados ao metabolismo de resistência e tolerância à ferrugem asiática da soja

Lívia Maria Nogueira^{1,2*}; Clara Beatriz Hoffmann-Campo¹; André Luiz de Lima Passianotto^{1,2}; J. P. da Graça^{1,2}; M. Z. Abrão^{1,5}; S. dos S. Pereira^{1,2}; D. C. G. da Silva^{1,2,3}; Alexandre Lima Nepomuceno¹; Ricardo Vilela Abdelnoor¹; N. Yamanaka^{1,4}.
¹Embrapa Soja, livia@cnpso.embrapa.br; ²Fundação Faculdades Luiz Meneghel - FFALM; ³Universidade Estadual Paulista, UNESP-Jaboticabal; ⁴Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS; ⁵Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL.

Introdução

A maioria das plantas selvagens e cultivadas produz metabólitos secundários constitutivos ou induzidos por estresses externos que atuam na sua defesa contra pragas. As substâncias constitutivas fazem parte da estrutura da planta, enquanto as induzidas, denominadas fitoalexinas, são produzidas após ser elicitadas por agentes estressantes externos. Essas substâncias são primariamente fungitóxicas, podendo afetar negativamente outros organismos como os nematóides e os insetos. Em soja, as fitoalexinas mais comuns são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos isoflavonóides.

Os isoflavonóides são comuns em leguminosas sendo as isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína e seus glicosídeos os mais freqüentemente em soja. As concentrações de genisteína e daidzeína foram marcadamente diferentes quando se comparam cultivares de soja (Carrão-Panizzi et al., 1999). Esses compostos são primariamente constitutivos, mas depois de serem danificadas por percevejos, observou aumento significativo de sua produção em vagens imaturas (Piubelli et al., 2003). Isoflavonóides com característica de fitoalexinas são relativamente comuns em soja, sendo as gliceolinas (pterocarpanos) e o coumestrol (coumestrans) os mais citados, principalmente em relação à proteção da planta. Após o ataque de nema-

tóides de cisto (*Heterodera glycines*) em raízes (Huang e Baker, 1991) e da falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*) em folhas de soja (Liu et al., 1992), observou-se a produção de gliceolinas, que foi maior nas cultivares resistentes do que nas susceptíveis. O composto fenólico denominado ácido salicílico tem sido citado como fator importante na indução de resistência a viroses e bacterioses (Nawrath et al., 2006). O objetivo deste trabalho foi identificar compostos químicos induzíveis por estresses causados pela ferrugem asiática em seu estágio infeccioso, comparando genótipos resistentes, tolerantes e suscetíveis submetidos ou não à doença.

Materiais e Métodos

Nos testes, utilizaram dois genótipos de soja, PI 230970 e PI 459025, que possuem genes de resistência à ferrugem asiática; uma cultivar considerada tolerante, BRS 231, e uma suscetível à doença, BRS184. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento (24°C, fotofase=12h) e 21 dias após a semeadura, quando se encontravam no estágio V3-V4 de crescimento, foram inoculadas com esporos de ferrugem, contendo 24.000 esporos/mL em solução de água + espalhante adesivo *tween*, foi pulverizada sobre as plantas. Nas testemunhas, foi aplicado apenas água + *tween*. A última folha completamente expandida de cada genótipo foi retirada a um e cinco dias após a aplicação de fungo ou água. Foram resfriadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para posterior análise. A confirmação da infecção por ferrugem foi realizada três semanas após a inoculação. A caracterização dos genótipos, os tratamentos e o estágio de desenvolvimento da soja quando se realizou a infecção e no momento da coleta das folhas para análise são apresentados na Tabela 1.

Para a realização das análises cromatográficas, os folíolos foram descongelados, moídos e pesados, sendo uma alíquota de 500 mg submetida à extração com 90% de metanol (MeOH) em água, o extrato obtido mantido em ultra-som por 20 minutos, filtrado e seco sob fluxo de nitrogênio gasoso. Cada amostra seca foi re-solubilizada em 1mL de MeOH 80% e filtrado, utilizando filtro de seringa "Acrodisc"; 20µL dessa solução foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC (Shimazu, Model SPD-M10A VP) equipado uma coluna específica para análises de flavonóides

Tabela 1. Caracterização dos genótipos, tratamentos e o estágio de desenvolvimento da soja no momento da infecção e da coleta das folhas para análise.

Genótipo	Reação à ferrugem	Tratamento	Estágio de desenvolvimento na inoculação	Estágio de desenvolvimento*
PI230970	Resistente <i>Rpp2</i>	C/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V3(5dai)
		S/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
PI459025	Resistente <i>Rpp4</i>	C/ esporos	V3	V3(1dai)-V3(5dai)
		S/ esporos	V3	V3(1dai)-V3(5dai)
BRS231	Tolerante	C/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
		S/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
BRS184	Suscetível	C/ esporos	V4	V3(1dai)-V4(5dai)
		S/ esporos	V4	V3(1dai)-V4(5dai)

* Estágio das amostras coletadas (últimas folhas adultas abertas). dai: dia após inoculação

(fase reversa do grupo octadesil: CLS-ODS-C18-M). O fluxo do solvente foi de 1 mL/min e a absorbância do espectro foi medida a 260nm e 280nm. Os compostos foram eluídos em um sistema de gradiente linear composto por 2% de ácido acético (HOAc, solvente A), e da mistura de MeOH: HOAc: água (18:1:1, solvente B). Padrões das isoflavonas conjugadas genisteína, daidzeína e gliciteína (glucosil, malonil e acetil) e as respectivas agliconas foram também injetadas, assim como o padrão de ácido salicílico e a mistura dos três isômeros mais comuns das gliceolinas.

Resultados e Discussão

Nos cromatogramas, não foram detectadas grandes diferenças entre os tratamentos. O ácido salicílico que está relacionado à resistência sistêmica adquirida (SAR) não foi detectado em nenhum dos extratos. Porém, o flavonol canferol e seus glicosídeos foram detectados em todos cultivares e todos os tratamentos. Glicosídeos baseados em quercitina também foram detectados em todas as cultivares e tratamentos, incluindo BRS 184. Entretanto, essa substância não foi observada nos quatro tratamentos de BRS 231. Os flavonóides, incluindo as gliceolinas, não apresentaram nenhuma relação nem com a resistência das Pis 230970 e 459025 ou com a

tolerância à ferrugem da cultivar BRS 231, por si mesmos, nem tampouco pelos estádios antecipados de desenvolvimento da ferrugem da soja.

Uma substância desconhecida, com espectro típico de flavona e com tempo de retenção entre 36 a 37min, foi detectada nos extratos de BRS 231 e da PI 459025 (um dia-água, um dia-ferrugem e cinco dias-água). Essa substância, entretanto, não foi observada nos extratos dos outros genótipos (BRS 184 e PI 230970), parecendo não estar relacionada com a ferrugem da soja. Por outro lado, malonil genisteína, considerado um dos metabólitos intermediário das gliceolinas, foi observado nos quatro tratamentos em um pico bem resolvido na PI 459025, ou co-eluído com o flavonol canferol na cultivar BR 184. Os demais tratamentos não apresentaram esse composto. A produção dessa substância parece não ter sido induzida e nem estar relacionada à resistência à ferrugem. Ainda, não foi possível observar nenhuma relação da ocorrência de malonil genisteína com gliceolinas. Esta possui três isoformas (gliceolina I, III e IV), todas analisadas neste estudo. A gliceolina IV não foi detectada, mas as isoformas I e III foram detectadas em pequena quantidade, na maioria das amostras. A gliceolina I foi detectada na linhagem PI 230970 (com gene *Rpp2*) no tratamento um dia após a inoculação, na PI 459025 (com gene *Rpp4*), também no tratamento um dia após a inoculação, e na BRS 184 (suscetível), no tratamento cinco dias após a inoculação. Não se observou gliceolina I em nenhum tratamento sem inoculação (água) e na BRS 231 (tolerante). Observou-se que esse flavonóide foi produzido de maneira diferente pelos genótipos resistentes à ferrugem asiática (PI 230970 e PI 459025) que possuem genes mais eficazes contra a ferrugem da soja no Brasil. A produção de gliceolina I, logo após a inoculação desses genótipos, indica que a sua produção pode ter sido induzida pela infecção pelo fungo. Com base nesses resultados, é possível que: (i) a reação mediada pela gliceolina I, nas duas cultivares resistentes, ocorre mais rapidamente do que na suscetível; (ii) a infecção na cultivar tolerante ocorre mais tardiamente, comparada com cultivares resistentes ou suscetíveis, sendo possivelmente essa a razão da BRS 231 não produzir gliceolina I.

A produção de gliocelina II foi também em quantidade muito pequena, sendo detectada nos quatro tratamentos e em todas as cultivares. Entretanto, observou-se que as diferenças na produção entre os genótipos e nos

estádios de desenvolvimento foram menos relacionadas à resistência à ferrugem, uma vez que essa também foi observada nos tratamentos não inoculados.

Devido à agressividade da ferrugem asiática, esperava-se que os flavonóide fitoalexinas pudessem ser induzidos pela doença em seus estádios de desenvolvimento mais precoces e que fossem produzidos unicamente em genótipos resistentes. Entretanto, isto não ocorreu e, para elucidar completamente o sistema de resistência contra a ferrugem da soja, estudos adicionais precisam ser realizados, principalmente no que se refere ao tempo de resposta das plantas à inoculação com o fungo causador da ferrugem asiática.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro através do orçamento do Presidente do Jircas (Japan International Research Center for Agricultural Sciences).

Referências

- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetic and environment on isoflavone contents of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, 1999. 1787p -1795 p.
- HUANG, J-H.; BARKER, K. R. Glyceollin I in Soybean-Cyst Nematode Interactions: Spatial and Temporal Distribution in Roots of Resistant and Susceptible Soybeans. *Plant Physiology* 96, 1991. 1302p–1307 p.
- LIU, S.; NORRIS, D. M.; HARTWIG, E. E.; XU, M. Inducible Phytoalexins in Juvenile Soybean Genotypes Predict Soybean Looper Resistance in the Fully Developed Plants. *Plant Physiology* 100, 1992. 1479p-1485p.
- NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J-P.; GENOUD, T. Chemical signals in plant resistance: salicylic acid. In: S. TUZUN and E. BENT (Ed.) *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, Springer, New York, 2006. 143p-165p.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C. de;
FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. *Journal of Chemical Ecology* 29, 2003. 1199p-1208p.