

## **Estudos dos efeitos da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) na produção de flavonóides em genótipos de soja**

---

JANEGITZ, T.<sup>1</sup>; RACHID, B.F.<sup>2</sup>; SILVA, D.M.<sup>3</sup>; MAEDA, J.M.<sup>4</sup>; ALBERTONI, T.T.<sup>1</sup> SOARES, R. M.<sup>5</sup>; HOFFMANN-CAMPO, C.B.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia – Unifil, tatiani@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL; <sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná – UFPR; <sup>4</sup>Universidade Estadual Norte do Paraná – UENP; <sup>5</sup>Embrapa Soja

A ferrugem-asiática da soja (FAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é uma importante doença da cultura, que atualmente está disseminada por todas as regiões produtoras de soja no Brasil. Estudos têm mostrado que a soja é capaz de responder a estresses provocados por microrganismos com a produção de metabólitos secundários constitutivos ou induzidos. As substâncias induzidas, denominadas fitoalexinas, são elicitadas por fitopatógenos, como resposta de defesa das plantas (Kuč, 2006).

Durante a infecção por patógenos, vários genótipos de soja aumentam a produção de compostos fenólicos, especialmente os genótipos resistentes, podendo ocorrer a produção de gliceolinas (Hoffmann-Campo, 2007). Sementes de soja também podem responder aos danos de percevejo sugadores de sementes por meio do aumento da concentração de compostos constitutivos como os isoflavonóides genistina e daidzeína (Piubelli et al., 2003). Essas substâncias podem, eventualmente, ser também responsáveis pela defesa das plantas a microrganismos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação fenotípica e a produção de flavonóides em três genótipos de soja inoculados com *P. pachyrhizi*.

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Soja (Londrina-PR) em plantas cultivadas em câmaras de crescimento (fitotron) com

controle de temperatura e luz, com os genótipos BRS 154 (padrão de suscetibilidade), BR01-18437 com hilo claro (HC) e hilo escuro (HE) e Shiranui (padrão de resistência). Os tratamentos consistiram em plantas inoculadas e plantas não inoculadas com o fungo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma composta por um vaso contendo cinco plantas.

Aos 21 dias após a semeadura as plantas foram pulverizadas com uma suspensão contendo 50.000 esporos/mL de água + 0,5 % de espalhante adesivo Tween 20. Cada vaso foi coberto individualmente com saco plástico (câmara úmida) durante 24h. Nas testemunhas não inoculadas foi aplicado apenas água + 0,5 % de Tween 20.

Para análise de flavonóides as coletas foram realizadas 48, 72, 96 e 120 horas, após a inoculação, utilizando o primeiro trifólio completamente expandido de cada genótipo. O tecido foi macerado em almofariz, com nitrogênio líquido, retirando-se uma alíquota de 200 mg que foi homogeneizada com 2 mL de metanol 90 % e submetida ao ultrassom por 20 min. Posteriormente, as amostras foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressolubilizadas com 1,5 mL de metanol 80 % e injetadas no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) para identificação e quantificação dos flavonóides.

Após 15 dias da inoculação foi feita a avaliação fenotípica da doença, verificando-se o tipo de lesão (RB – resistente, ou Tan - suscetível), a quantidade de esporulação (notas de 0 a 3), o número de urédias por lesão e a severidade no trifólio mais infectado, usando escala diagramática desenvolvida para FAS (Godoy et al., 2006). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os genótipos Shiranui e BRS 154 apresentaram resultados esperados quanto à reação fenotípica (Tabela 1). Os genótipos BR01-18437 HC e HE mostraram lesões do tipo RB, mas, a esporulação não diferiu do padrão de suscetibilidade. Esse fato pode ser explicado pelo fato do gene

de resistência desse genótipo ser derivado do genótipo PI 203398, que possui um gene de resistência recessivo a FAS (Pierozzi et al., 2008). Dessa forma, embora a BR01-18437 tenha apresentado lesões do tipo RB, não conseguiu controlar com eficiência a esporulação dessas lesões.

**Tabela 1.** Análise fenotípica dos genótipos de soja à ferrugem-asiática.

Genótipos	Nº urédias/ lesão	Severidade (%)	Esporulação (nota 0 a 3)	Tipo de lesão
BRS 154	4,3 a*	14,2 a	3	Tan***
BR01-18437 (HC)	3,1 b	12,2 a	3	RB
BR01-18437 (HE)	3,1 b	17,8 a	3	RB
Shiranui	0,4 c	18,0 a	1,2	RB
C.V. (%)	17,74	37,37		

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*\*\*Tan = marrom-claro; RB = marrom-avermelhado

Nas análises cromatográficas foram identificados diversos flavonóides e com maior intensidade daidzina, genistina, malonil genistina, malonil daidzina e daidzeína, os quais apresentaram interação significativa entre os fatores inoculação x período de coleta (Tabela 2) e para os compostos genistina e malonil daidzina para inoculação x genótipo (Tabela 3). As concentrações de daidzina, genistina, malonil daidzina e malonil genistina foram sempre significativamente maiores em plantas inoculadas com o patógeno, nas coletas realizadas 48, 72 e 96 horas após a inoculação, com exceção da genitina com 96h (Tabela 2). Já na coleta realizada 120h após a inoculação, as plantas não inoculadas apresentaram maior concentração de todas as substâncias, exceto a malonil genistina.

A concentração de genistina nos genótipos BR01-18437(HE) e BRS 154 foi maior nas plantas inoculadas comparadas com as não inoculadas (Tabela 3). A concentração de malonil daidzina nos genótipos BR01-18437(HC) e BRS 154, também aumentou nas plantas inoculadas em comparação com as não inoculadas.

**Tabela 2.** Análise da produção de flavonóides com interação inoculação versus período de coleta, para as diferentes substâncias.

		48 h	72 h	96 h	120 h
Daidzina	I	0,0144 A a	0,0197 A a	0,0196 A a	0,0021 B b
	NI	0,0030 B b	0,0080 AB b	0,0091 AB b	0,0112 A a
Genistina	I	0,0606 A a	0,0820 A a	0,0665 A a	0,0093 B b
	NI	0,0382 A b	0,0291 A b	0,0503 A a	0,0477 B a
Malonil Daidzina	I	0,0152 BC a	0,0368 A a	0,0265 AB a	0,0010 C b
	NI	0,0006 A b	0,0033 A b	0,0101 A b	0,0132 A a
Malonil Genistina	I	0,1473 A a	0,1749 A a	0,1806 A a	0,0112 B a
	NI	0,0582 A b	0,0246 A b	0,0586 A b	0,0464 A a
Daidzeína	I	0,0031 A a	0,0032 A a	0,0056 A a	0,0040 A b
	NI	0,0026 B a	0,0048 AB a	0,0071 A a	0,0080 A a

Letras minúsculas na coluna comparam concentração de cada flavonóides em genótipos inoculados com não inoculados. Letras maiúsculas na linha comparam concentração de flavonóides dentro dos tempos de coleta de folhas. I = inoculado; NI = não inoculado.

**Tabela 3.** Análise da produção de flavonóides com interação inoculação versus genótipo, para as diferentes substâncias.

		BR01-18437 (HC)	BR01-18437 (HE)	Shiranui	BRS 154
Genistina	I	0,0446 B a	0,0807 A a	0,0387 B a	0,0522 B a
	NI	0,0408 A a	0,0495 A b	0,0443 A a	0,0307 A b
Malonil Daidzina	I	0,0202 AB a	0,0179 B a	0,0053 B a	0,0356 A a
	NI	0,0068 A b	0,0081 A a	0,0025 A a	0,0096 A b

Letras minúsculas na coluna comparam concentração de flavonóides em genótipos inoculados com não-inoculados. Letras maiúsculas na linha comparam concentração de flavonóides dentro dos tempos de coleta de folhas. I = inoculado, NI = não-inoculado; HC = hilo claro, HE = hilo escuro.

A fitoalexina gliceolina II foi identificada em algumas amostras e, em Shiranui, foi observada tanto em plantas inoculadas como em não-inoculadas, nos quatro períodos de coleta, sugerindo que esse composto possa ser a principal substância de defesa contra a ferrugem-asiática da soja.

Nas próximas etapas serão conduzidos novos experimentos com a mesma metodologia de plantio e inoculação, porém utilizando os

genótipos BRS 154 (padrão de suscetibilidade), Shiranui (padrão de resistência), as linhagens BRQ07-00316 e BRQ07-00876 e a cultivar BRSGO 7560 (BR01-18437 hilo escuro). Adicionalmente, as coletas serão realizadas, além de 48, 72, 96 e 120h, também em 0 (antes da inoculação) e 24h após inoculação da suspensão de esporos, utilizando o primeiro trifólio completamente expandido de cada genótipo para análise de flavonóides. Após a coleta, o material será condicionado imediatamente em nitrogênio líquido e macerado em almofariz. Uma alíquota de 500 mg proveniente da maceração será homogeneizada com 3 mL de metanol 80 % e submetida a ultrassom por 20 min. Posteriormente, as amostras serão evaporadas a vácuo, ressolubilizadas com 1,5 mL de metanol 80 %, filtradas e injetadas no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC). Durante as análises, a absorbância será medida em 260nm para identificação dos flavonóides e 280nm para gliceolinas. Após 15 dias da inoculação será feita avaliação fenotípica da doença. Os dados serão submetidos ao teste de Tukey a 5 % de probabilidade e qui-quadrado (para gliceolinas).

## Referências

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.63-68, 2006.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. Respostas da soja a estresses bióticos e abióticos. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA, 5., 2007, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, p.40, 2007.

KUĆ, J. What´s old and what´s new in concepts of induced systemic resistance in plants, and its application. In: TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. New York: Springer, 2006. v. 1, p.9.

PIEROZZI, P.H.B.; RIBEIRO, A.S.; MOREIRA, J.U.V.; LAPERUTA L.D.C.; RACHID, B.F.; LIMA, W.F.; ARIAS, C.A.A.; OLIVEIRA M.F.O.; TOLEDO, J.F.F. New soybean (*Glycine max* Fabales, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). **Genetic Molecular Biology**, v.31, n.2, 2008.

PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I.C.; 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 Chemical Ecology** v.29, p. 1223-1233, 2003.