

Avaliação fenotípica e de metabólitos secundários de genótipos de soja resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática.

GHIZONI, P. A. S.^{1,3}; GRAÇA, J. P.³; DIAS, B. F.^{1,4}; ABELHA, A.^{1,3}; UEDA, T. E.^{2,3}; SALVADOR, M. C.³; OLIVEIRA, M. F.³; NUNES, E. O.³; HOFFMANN-CAMPO, C. B.^{3,1,3}Bolsista CNPq-PIBIC,

¹ Universidade Norte do Paraná, pauloalgustoghizoni@gmail.com; ² Universidade Estadual de Londrina; ³ Embrapa Soja.

Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2001, no Estado do Paraná. O fungo é capaz de se desenvolver em temperaturas que variam de 15°C a 30°C, podendo se adaptar a qualquer região brasileira e causar severas perdas na cultura da soja (EMBRAPA, 2004). Em surtos epidêmicos da doença foram relatadas perdas de até 80% na produção; estima-se que já houve um gasto de 19 bilhões de dólares para o Brasil, incluindo o controle da doença com fungicidas e as perdas de produtividade, com média anual de US\$ 2 bilhões por safra nos últimos anos (FAPCEN, 2015; GODOY et al., 2006a).

Uma das estratégias de manejo da doença é o uso de cultivares resistentes, que é considerada a forma mais econômica de controle (PIEROZZI et al., 2008). Até o momento foram identificados seis genes de resistência à ferrugem, sendo denominados de *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *rpp5* e *Rpp6* (LI et al., 2012). Além dos genes de resistência à FAS, que são mecanismos de defesa para evitar a infecção do fitopatógeno (AGRIOS, 2005), as plantas produzem, normalmente, uma série de compostos orgânicos de baixo peso molecular sem aparente função no seu crescimento e ou desenvolvimento (HOFFMANN-CAMPO.,1995). Essas substâncias, denominadas metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2010) e cuja distinção no perfil de composição e concentração dos mesmos entre cultivares, permite a diferenciação entre resistentes, tolerantes e suscetíveis quando correlacionado com seu comportamento fenotípico. Estudos têm mostrado que a cultura da soja é capaz de responder a estresses provocados por microrganismos com a produção desses metabólitos secundários. Durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*, genótipos de soja aumentam a produção de compostos fenólicos, especialmente os resistentes onde pode ocorrer a produção de fitoalexinas como as gliceolinas (NOGUEIRA et al.,2006; YAMAOKA et al., 2002).

Com a seleção de plantas com maior produtividade e outras características agrônômicas é provável que, a soja e outras culturas tenham perdido alguns mecanismos de defesa (KOGAN et al., 1999). Assim, o retorno aos genótipos ou PIs ("*Plant Introductions*") permitirá a identificação de materiais com respostas rápidas, intensas e persistentes. Isso deve ser visto como um componente importante de programas de melhoramento, a fim de, proteger as plantas durante as suas fases mais sensíveis do desenvolvimento (KOGAN; FISCHER, 1991). O objetivo deste trabalho foi selecionar genótipos de soja resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática pela sua resposta fenotípica e o seu perfil metabólico.

Material e métodos

Foram selecionados nove genótipos de soja, de acordo com características fenotípicas (WALKER et al.,2014) das lesões de

resistência – RB (*Reddish-Brown*) - (PI-224270, PI-507259, PI-567102B, PI-567046A) e suscetibilidade -TAN (PI-200492, PI-417116, PI-594172A, PI-615445 e PI-617045). Os genótipos foram semeados, em vasos de 5 L contendo 1 kg de mistura de terra, areia e esterco na proporção 3:1:2, com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 14 horas, até estágio V5, em casa de vegetação contendo 5 plantas por vaso (FEHR & CAVINESS, 1977).

O inóculo de *P. pachyrhizi* foi obtido pela coleta de esporos em plantas da cultivar BRS 316 (suscetível) infectadas, cultivadas em casa de vegetação. Os esporos foram suspensos em água + tween 20 (agente dispersor) a 0,5% (V/V), com concentração final de $1,89 \times 10^5$ esporos mL⁻¹ de água. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer. A suspensão foi inoculada nas plantas com pulverizador costal.

O quarto trifólio foi coletado 11 dias após a inoculação, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (-80°C). As amostras foram maceradas e uma alíquota de ≈ 700 mg foi utilizada para extração e adicionados 5 mL de metanol 90%. As amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos, levadas ao banho de ultrassom por 20 minutos e novamente agitadas por 5 segundos. O material foi centrifugado a 5650 rpm a 2°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e seco em vácuo, e resolubilizado com metanol 80% ajustando o volume de acordo com a massa inicial de extração (1000 mg mL⁻¹) e filtradas em membrana Milipore® 0,45 μ m, transferidas para tubos de injeção automática e analisadas pelo sistema Prominence® (Shimadzu) composto de HPLC (high performance liquid chromatograph) e detector PDA (photo diodo array), de acordo com metodologia cromatográfica e quantitativa adotada por Graça (2012). A fase móvel foi composta dos solventes: (A)-2% de ácido acético (HOAc) e (B)-metanol, ácido acético e água (MeOH:HOAc:H₂O; 18:1:1) e o fluxo utilizado de 1 mL/min⁻¹.

Para a avaliação da reação fenotípica, o terceiro trifólio foi coletado 20 dias após a inoculação e, no laboratório com auxílio de um amplificador

óptico binocular (OptiVisor-da10blue®) foram determinados os tipos de lesão, RB (resistência), TAN (susceptibilidade), RT (predomínio de RB, com menos TAN) ou TR (predomínio de TAN, com menos RB). A quantidade relativa de esporulação foi medida e expressa com auxílio de escala de notas de 0 (sem esporulação) a 3 (maior esporulação) e a porcentagem da área foliar infectada (AFI) estimada através de escala diagramática de severidade (GODOY et al., 2006b).

Para o ensaio foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com nove genótipos de soja inoculados e quatro repetições.

Resultados e discussão

De modo geral, as PIs apresentaram diferenças fenotípicas quanto a doença e na concentração de compostos secundários na folha. A PI 567102B (RB) apresentou menor porcentagem de área foliar infectada (AFI) e baixa esporulação (Tabela 1). Esse genótipo possui o gene de resistência *Rpp6* (WALKER et al., 2014), fator este que pode ter contribuído para os resultados fenotípicos obtidos nesse material. Em contrapartida, a PI 224270 (RB) mesmo apresentando alta porcentagem de AFI (severidade alta), exibiu baixa esporulação, a que pode estar associada à presença do gene de resistência *Rpp2*.

Os genótipos PI 471116 e PI 594172A (TAN), apesar de serem considerados suscetíveis à FAS, apresentaram severidade e esporulação menores quando comparados a PI 617045 (TAN) que teve a maior nota de esporulação entre os genótipos. Os demais apresentaram uma porcentagem de AFI intermediária e baixa esporulação mesmo com lesões do tipo TAN e RT.

Em relação à concentração de compostos secundários, a PI 615445 (TAN) além da baixa esporulação, apresentou as maiores concentrações de daidzina, malonil-daidzina, malonil-genistina e coumestrol e elevada nível de genistina (Figura 1). Entretanto, a PI 617045 (TAN) mesmo tendo alta concentração de compostos (daidzina, malonil-daidzina, malonil-glicitina e coumestrol) apresentou altas severidade e esporulação. Nos extratos da PI 200492 (TAN),

que possui o gene Rpp1, foi identificado apenas as substâncias rutina e daidzina em baixas concentrações. A PI 417116 (TAN) apresentou todos os compostos investigados, exceto a genistina. Já a PI 567102B (RB) que apresentou as maiores concentrações de genistina e rutina também exibiu a menor severidade e baixa esporulação.

Isoflavonoides com característica de fitoalexinas são relativamente comuns em soja, sendo as gliceolinas (pterocarpanos) e o coumestrol (coumestrans) citados em relação à proteção da soja a estresses bióticos (NOGUEIRA et al., 2006). No presente trabalho, a produção de gliceolinas em especial a do tipo III (dados não apresentados) foi observada em todos os genótipos. O acúmulo de compostos fenólicos e, incluindo-se gliceolinas tem sido descrito após a infecção com *Phytophthora megasperma* (GRAHAM et al., 1990; GRAHAM; GRAHAM, 1991; CHENG et al., 2011). As ações das fitoalexinas sobre fungos são diversas incluindo granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas (LO et al., 1996). Esses efeitos, segundo os autores, inibem a germinação e alongamento do tubo germinativo e reduz ou inibe o crescimento miceliano.

Conclusão

Os resultados indicam que a PI 567102B (RB) apresenta características fenotípicas favoráveis de resistência e alta concentração da isoflavona genistina e do flavonol rutina, quando comparados aos demais genótipos testados. Estudos adicionais de avaliações fenotípicas e sua correlação com metabólitos secundários estão sendo conduzidos. O presente trabalho é parte da etapa de avaliação realizada por HPLC, da análise de 132 genótipos do banco ativo de germoplasma da Embrapa Soja e visa associar estes compostos secundários com a descoberta de novos compostos identificados por espectrometria de massa, que possam acelerar a seleção de genótipos para o melhoramento e desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

CHENG, J.; YUAN, C.; GRAHAM, T.L. Potential defense-related prenylate disoflavones in lactofen-induced soybean. **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 875–881, 2011.

YORINORI, J.T.; LAZZAROTTO, J.J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004, 30 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 236).

FAPCEN: Fundação de Apoio à Pesquisa Corredor de Exportação Norte. Ferrugem asiática causa prejuízos de **US\$ 8 bilhões em MT**. Disponível em: < <http://www.fapcen.agr.br/?p=80> >. Acesso em: 13 abr. 2015.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p. (Special report, 80).

GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A. **Histórico do vazio sanitário como medida de manejo da ferrugem asiática da soja**. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br/download/HistoricoVazio.doc> > Acesso em: 03 abr 2015.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63-68, 2006.

GRAÇA, J.P. da. **Cis-Jasmone e Tween 20 na indução de metabólitos secundários em soja e seus efeitos em insetos-praga**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo.

GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. **Plant Physiology**, v. 97, n. 4, p. 1445–1455, 1991.

GRAHAM, T.L.; KIM, J.E.; GRAHAM, M.Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 157–166, 1990.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soyabean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 f. Dissertation (PHD) The University of Reading, Reading.

KOGAN, M.; FISCHER, D.C.; Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In: TALLAMY, W.D.; RAUPP, M.J. (eds.). **Phytochemical induction by herbivorous insects**. Wiley: New York, p. 347–380, 1991.

KOGAN, M.; DE BORTOLI, S.; HELM, C.G. Soybean resistance and IPM: Testing the vulnerability of improved varieties to insect pests. In CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, pp. 267–274, 1999. (Embrapa Soja. Documentos, 124).

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 125, n. 1, p. 133-142, 2012.

LO, L.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ester of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 21-31, 1996.

NOGUEIRA, L. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; PASSIANOTTO, A. L. de L.; GRAÇA, J. P. da; ABRÃO, M. Z.; PEREIRA, S. dos S.; SILVA, D. C. G. da; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; YAMANAKA, N. Estudos preliminares relacionados ao metabolismo de resistência e tolerância à ferrugem asiática da soja. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 2., 2006, Londrina. **Resumos expandidos**. Londrina: Embrapa Soja, p. 186-191. (Embrapa Soja. Documentos, 276), 2006.

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 resistente to Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p. 505-511, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**., 5th edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2010. 782 p.

WALKER, D.R.; HARRIS, D.K.; KING, Z.R.; LI, Z.; PHILLIPS, D.V.; BUCK, J.W.; NELSON, R.L.; BOERMA, H.R. Soybean germplasm accession seedling reactions to soybean rust isolates from Georgia. **Crop Science**, v. 54, p. 1433-1447, 2014

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**. v. 68, n. 1, p. 52-56, 2002.

Tabela 1. Avaliação fenotípica dos genótipos de soja inoculados com *P. pachyrrhizi* avaliada pela percentagem ferrugem, tipo de lesão, esporulação e presença ou ausência de genes de resistência.

Genótipos	(%) Severidade	Lesão	Esporulação	Genes <i>Rpps</i>
PI 567102 B	12,5	RB	1	<i>Rpp 6</i>
PI 417 116	22,5	TAN	0,5	-----
PI 594172 A	25	TAN	0,75	-----
PI 615445	27,5	TAN	1	-----
PI 507259	30	RT	1	-----
PI 567046 A	31,25	RT	1	-----
PI 200492	32,5	TAN	1	<i>Rpp 1</i>
PI 617045	47,5	TAN	2,75	-----
PI 224270	48,75	RB	0,5	<i>Rpp 2</i>

* RB – resistente; TAN – suscetível; RT - predomínio de RB, com menos TAN; TR - predomínio de TAN, com menos RB; A esporulação foi medida de notas de 0 (sem esporulação) a 3 (maior esporulação) e a porcentagem (%) de ferrugem estimada através de escala diagramática da FAS. (GODOY et al., 2006^b).

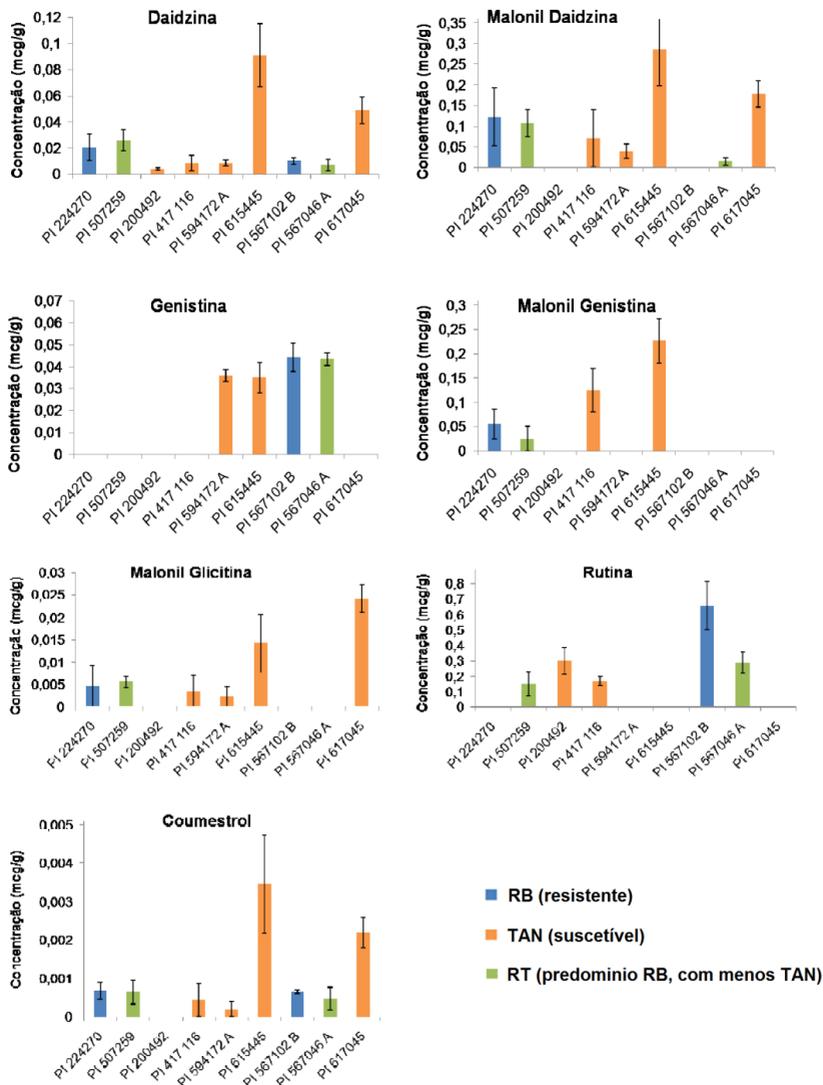


Figura 1. Concentração das isoflavonas daidzina, malonil-daidzina, genistina, malonil-genistina, malonil-glicitina, rutina e coumestrol em genótipos de soja inoculadas com ferrugem asiática. Médias e erro padrões.