

# Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja

Hebréia Oliveira Almeida<sup>(1)</sup>, Meire de Oliveira Barbosa<sup>(1)</sup>, Ana Ermelinda Marques<sup>(1)</sup>,  
Tânus Henrique Abdalla Pereira<sup>(1)</sup>, Marcos Jorge Magalhães Júnior<sup>(1)</sup>, Nayara Gusmão Tessarollo<sup>(1)</sup>,  
Patrícia Dias Games<sup>(1)</sup>, Everaldo Gonçalves de Barros<sup>(2)</sup>, Renata Stolf-Moreira<sup>(3)</sup>,  
Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães<sup>(3)</sup>, Ricardo Vilela Abdelnoor<sup>(3)</sup>,  
Paulo Roberto Gomes Pereira<sup>(4)</sup> e Maria Cristina Baracat-Pereira<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Avenida P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36570 000 Viçosa, MG. E-mail: hebreia@yahoo.com.br, meirebqi@gmail.com, anaerme@gmail.com, tanusabdalla@hotmail.com, marcosjorgejr@hotmail.com, nayaratessarollo@gmail.com, patriciadiasgames@yahoo.com.br, baracat@ufv.br <sup>(2)</sup>UFV, Departamento de Biologia Geral. E-mail: ebarros@ufv.br <sup>(3)</sup>Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001 970 Londrina, PR. E-mail: renatastolf@hotmail.com, francm@cnpso.embrapa.br, ricardo@cnpso.embrapa.br <sup>(4)</sup>UFV, Departamento de Fitotecnia. E-mail: ppereira@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de enzimas marcadoras, a indução de resistência à ferrugem-asiática-da-soja em genótipos de soja contrastantes quanto à suscetibilidade a *Phakopsora pachyrhizi*. A proteína total e as atividades de cinco enzimas marcadoras da indução de resistência (lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases) foram avaliadas em extratos de folhas de plantas de soja dos genótipos Embrapa 48 (suscetível) e PI 561356 (resistente), submetidas à inoculação ou não com o patógeno. Foram observadas respostas de defesa discrepantes entre os dois genótipos e entre os tempos de coleta (12, 72 e 168 horas após inoculação). A resposta de indução dessas enzimas assemelha-se à defesa bifásica, para Embrapa 48, e é consistente com o observado para outros patossistemas. No entanto, o genótipo PI 561356 respondeu com diminuição da concentração de proteína total e das atividades enzimáticas, o que indica redução do metabolismo geral das plantas infectadas. Há um importante mecanismo de resistência do genótipo PI 561356, ainda não relatado, embasado em vias que envolvem essas enzimas marcadoras e em mecanismos que utilizam menor concentração de proteínas, como os de via metabólica de resposta em cascata.

Termos para indexação: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, atividade enzimática, mecanismos de defesa, resistência sistêmica, resposta em cascata.

## Differentially regulated induced resistance marker enzymes in soybean genotypes resistant and susceptible to Asian soybean rust

Abstract – The objective of this work was to evaluate induced resistance to Asian soybean rust by means of enzyme activities in soybean genotypes contrasting as to their susceptibility to *Phakopsora pachyrhizi*. Total protein and the activities of five induced resistance marker enzymes (lipoxigenases, peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases) were evaluated in leaf extracts of soybean plants of the genotypes Embrapa 48 (susceptible) and PI 561356 (resistant), inoculated or not with the pathogen. Discrepant defense responses were obtained between the two genotypes and among the leaf harvest times (12, 72, and 168 hours after inoculation). The induction response of these enzymes resembles the biphasic defense in Embrapa 48 and is consistent with that observed in other pathological systems. However, the genotype PI 561356 responded with a decrease in total protein concentration and in enzymatic activities, indicating a general reduction in the metabolism of the infected plants. There is an important mechanism of resistance for the genotype PI 561356, not yet reported, which is grounded on the metabolic ways involving these induced resistance marker enzymes and on the mechanisms that use lower concentrations of total protein, such as the ones with metabolic pathways in response cascade.

Index terms: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, enzymatic activity, defense mechanisms, systemic resistance, response cascade.

### Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, com 49% da área plantada com grãos do país

(Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011). A ferrugem-asiática-da-soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., foi registrada pela primeira vez no país na safra de 2001/2002. Essa doença promove a desfolha precoce e compromete o

enchimento de vagens e grãos (Choi et al., 2008). Desde 2008, o Brasil é membro do Consórcio Internacional do Genoma da Soja e tem estudado meios de identificar, em nível proteico, genes envolvidos em respostas a estresses.

As plantas, em geral, respondem a estresses abióticos ou bióticos por mecanismos de defesa pré-formados ou pós-formados, em sucessivos eventos e sinais, desde o reconhecimento do agressor até a ativação das barreiras físicas e químicas de defesa. A resistência das plantas a doenças envolve a ativação de mecanismos latentes, frente a indutores externos, sem qualquer alteração no genoma da planta (Baysal et al., 2003). A indução de proteínas pode estar relacionada à patogênese por infecções ou por agentes químicos ou ambientais. As alterações nas atividades dessas enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (Macagnan et al., 2008). Entre essas enzimas, estão as lipoxigenases, as peroxidases, a fenilalanina amônia-liase, as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases (Baysal et al., 2003).

As lipoxigenases, EC 1.13.11.12 (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2011), catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, o que origina compostos voláteis e o regulador traumatina, entre outros, envolvidos no crescimento, na maturação, na senescência e em respostas de defesa das plantas (Baysal & Demirdoven, 2007). As peroxidases (EC 1.11.1.7) oxidam substratos orgânicos por meio da eliminação do peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio e aceptora de elétrons. Além disso, essas enzimas participam do crescimento e do desenvolvimento vegetais, da destoxificação celular e de mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos (Baysal et al., 2003). A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) é fundamental na biossíntese de fenilpropanóis e participa da síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides (Gerasimova et al., 2005). As quitinases (EC 3.2.1.14) catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 das N-acetilglicosaminas, que constituem a quitina das paredes celulares dos fungos. Já as  $\beta$ -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) hidrolisam  $\beta$ -1,3-glucanas das paredes celulares e dos esporos de fungos (Wu & Bradford, 2003). Em plantas, as quitinases e as  $\beta$ -1,3 glucanases

são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresse (Wu & Bradford, 2003).

Para o patossistema soja-*P. pachyrhizi*, pouco se conhece sobre os mecanismos de defesa das plantas à infecção (Mortel et al., 2007; Schneider et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de enzimas marcadoras, a indução de resistência à ferrugem-asiática-da-soja em genótipos de soja contrastantes quanto à suscetibilidade a *P. pachyrhizi*.

## Material e Métodos

O genótipo PI 561356, que apresenta um gene de resistência à ferrugem-asiática-da-soja mapeado no grupo de ligação G, próximo a *Rpp1*, desenvolve lesões marrom-avermelhadas (“reddish brown”, RB), com nenhum ou poucos esporos após infecção. Já a cultivar Embrapa 48, suscetível à ferrugem-asiática-da-soja, desenvolve lesões castanho-claro.

As sementes de ambos os genótipos foram germinadas, e, com três dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas sob luz incandescente por dez dias. Uma população de *P. pachyrhizi*, coletada em lavouras de soja no Estado do Mato Grosso (Yorinori et al., 2005), foi mantida por mais de dez gerações na cultivar de soja BRSM5-Bacuri (susceptível), em casa de vegetação, na Embrapa Soja. Para o preparo do inóculo, os esporos de *P. pachyrhizi* foram coletados manualmente das folhas desta cultivar, no dia da inoculação. Em seguida, uma suspensão foi preparada em Tween 20 a 0,05%, em água destilada, e ajustada para  $1,4 \times 10^5$  uredósporos por mL.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de: plantas de cada genótipo submetidas à inoculação, com folhas coletadas às 12, 72 e 168 horas após a inoculação; e plantas de cada genótipo não submetidas à inoculação (controle), com folhas coletadas nos mesmos tempos. Cada repetição foi constituída por um vaso contendo duas plantas.

Plantas com 27 dias, no estágio de desenvolvimento V2, foram pulverizadas com a suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* e mantidas isoladas em câmara úmida por um dia. Nos tratamentos controle, as plantas foram pulverizadas com Tween 20 a 0,05% em água destilada.

Todas as folhas de cada planta foram coletadas, nos tempos previstos dos tratamentos. Em seguida, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o preparo de extratos vegetais.

Para o preparo dos extratos, 5,0 g de folhas de soja de cada tratamento foram pulverizados separadamente em nitrogênio líquido. O pó foi macerado com polivinilpirrolidona a 2% e Tris-HCl a  $50\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0 (1:3, g:mL), acrescido de  $1,0\text{ mmol L}^{-1}$  de fluoreto de fenilmetilsulfonila e de benzamidina. Os extratos foram centrifugados a  $20.100\text{ g}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 25 min, e os sobrenadantes foram recuperados.

A quantificação da proteína total foi realizada segundo Bradford (1976), ajustada para micro-quantidades. Placas de 96 poços receberam 20 e  $40\text{ }\mu\text{L}$  da amostra e  $160\text{ }\mu\text{L}$  do reagente concentrado 1,25 vezes. Após 10 min à temperatura ambiente, fez-se a leitura das microplacas a 595 nm. A curva-padrão foi preparada com albumina sérica bovina (BSA) entre 0 e  $60\text{ }\mu\text{g}$ , através da equação:  $y = 0,0865x + 0,0843$  ( $R^2 = 0,9928$ ), e os resultados corresponderam à média de três replicatas.

As lipoxigenases foram avaliadas pela absorbância a 234 nm em linoleato de sódio  $10\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 9,0, como substrato, em mistura de reação constituída de  $1.000\text{ }\mu\text{L}$  de fosfato de sódio  $50\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0,  $20\text{ }\mu\text{L}$  do substrato e  $10\text{ }\mu\text{L}$  do extrato vegetal, conforme Silva et al. (2004). O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) dos hidroperóxidos para o ácido linoleico foi  $25.000\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , a pH 6,0. A atividade específica das lipoxigenases foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido do ácido linoleico por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína.

As peroxidases foram avaliadas em 470 nm, a  $30^{\circ}\text{C}$ , pela produção de tetraguaiacol, conforme Silva et al. (2004). A mistura de reação foi constituída de  $1.019\text{ }\mu\text{L}$  de solução de reação ( $125\text{ }\mu\text{L}$  de guaiacol,  $153\text{ }\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio e  $50\text{ mL}$  de fosfato de sódio  $10\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0) e  $1,0\text{ }\mu\text{L}$  do extrato vegetal. Após incubação, os valores de absorbância foram avaliados em dois momentos da reação, e a atividade das peroxidases foi expressa em variação da absorbância a 470 nm por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína.

A fenilalanina amônia-liase foi avaliada conforme Silva et al. (2004), com modificações, por meio da conversão de L-fenilalanina para ácido cinâmico a 290 nm e  $37^{\circ}\text{C}$ , em dois momentos da reação. A mistura da reação consistiu de  $10\text{ }\mu\text{L}$  do extrato foliar e  $1.000\text{ }\mu\text{L}$  de solução a 0,2% de L-fenilalanina. A curva-padrão

para o ácido cinâmico foi  $y = 0,3621x - 0,3891$  ( $R^2 = 0,9968$ ) e a atividade de fenilalanina amônia-liase foi expressa em nanomol de ácido cinâmico por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína.

As quitinases foram avaliadas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, por meio da variação colorimétrica da reação sobre o substrato Chitin Azure (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP), a partir de fragmentos insolúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV) (Hackman & Goldberg, 1964). Fragmentos ( $50\text{ }\mu\text{g}$ ) do substrato insolúvel foram acrescidos de  $600\text{ }\mu\text{L}$  de tampão e  $400\text{ }\mu\text{L}$  do extrato. Em seguida, a mistura foi incubada, e os valores de absorbância a 575 nm da amostra e do controle foram avaliados. Na reação-controle, o extrato foi substituído por tampão. A atividade foi expressa em variação da absorbância a 575 nm por dia por g de quitina por  $\mu\text{g}$  de proteína.

As  $\beta$ -1,3-glucanases foram determinadas pela variação da absorbância a 410 nm sobre laminarina, com uso de hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura de reação, contendo  $220\text{ }\mu\text{L}$  de acetato de sódio  $100\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,0,  $250\text{ }\mu\text{L}$  de substrato ( $4,0\text{ mg mL}^{-1}$  de laminarina) e  $30\text{ }\mu\text{L}$  do extrato vegetal, foi incubada a  $45^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Em seguida, foi acrescentado  $1,5\text{ mL}$  de solução de desenvolvimento de cor ( $0,5\text{ g}$  de HAPHB dissolvido em  $10\text{ mL}$  de HCl  $0,5\text{ mol L}^{-1}$ , acrescido de  $50\text{ mL}$  de NaOH  $0,5\text{ mol L}^{-1}$ ). A mistura foi aquecida a  $100^{\circ}\text{C}$ , por 5 min, e resfriada em gelo até  $30^{\circ}\text{C}$ , para determinação dos valores de absorbância. O controle correspondeu à mistura sem incubação. Os resultados foram expressos em unidades de variação da absorbância a 410 nm por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados 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 avaliadas em função do tempo.

## Resultados e Discussão

Os genótipos de soja Embrapa 48 e PI 561356, suscetível e resistente à ferrugem-asiática-da-soja, respectivamente, apresentaram concentração proteica e atividades de cinco enzimas relacionadas à indução de resistência com comportamentos muito discrepantes, quando avaliados às 12, 72 e 168 horas após a

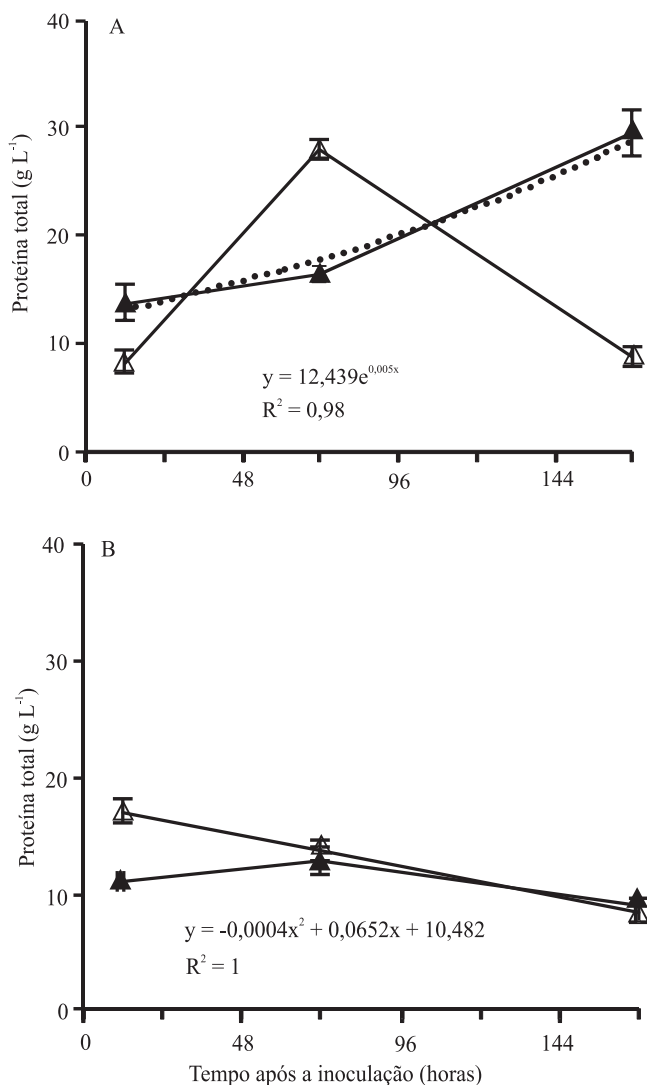
inoculação com *P. pachyrhizi* (Figuras 1, 2 e 3). Apenas as atividades de fenilalanina amônia-liase foram mantidas altas durante todo o período de avaliação, em ambos os genótipos (Figura 2 E e F). A comparação das atividades dessas enzimas em plantas do mesmo genótipo, submetidas ou não à inoculação, e entre plantas de diferentes genótipos, indica que a resposta de indução ou ativação dessas enzimas assemelha-se à defesa bifásica para Embrapa 48, e é consistente com a

observada para outros patossistemas. Contudo, após a inoculação do fungo, as plantas do genótipo PI 561356 responderam com diminuição da concentração da proteína total e das atividades enzimáticas.

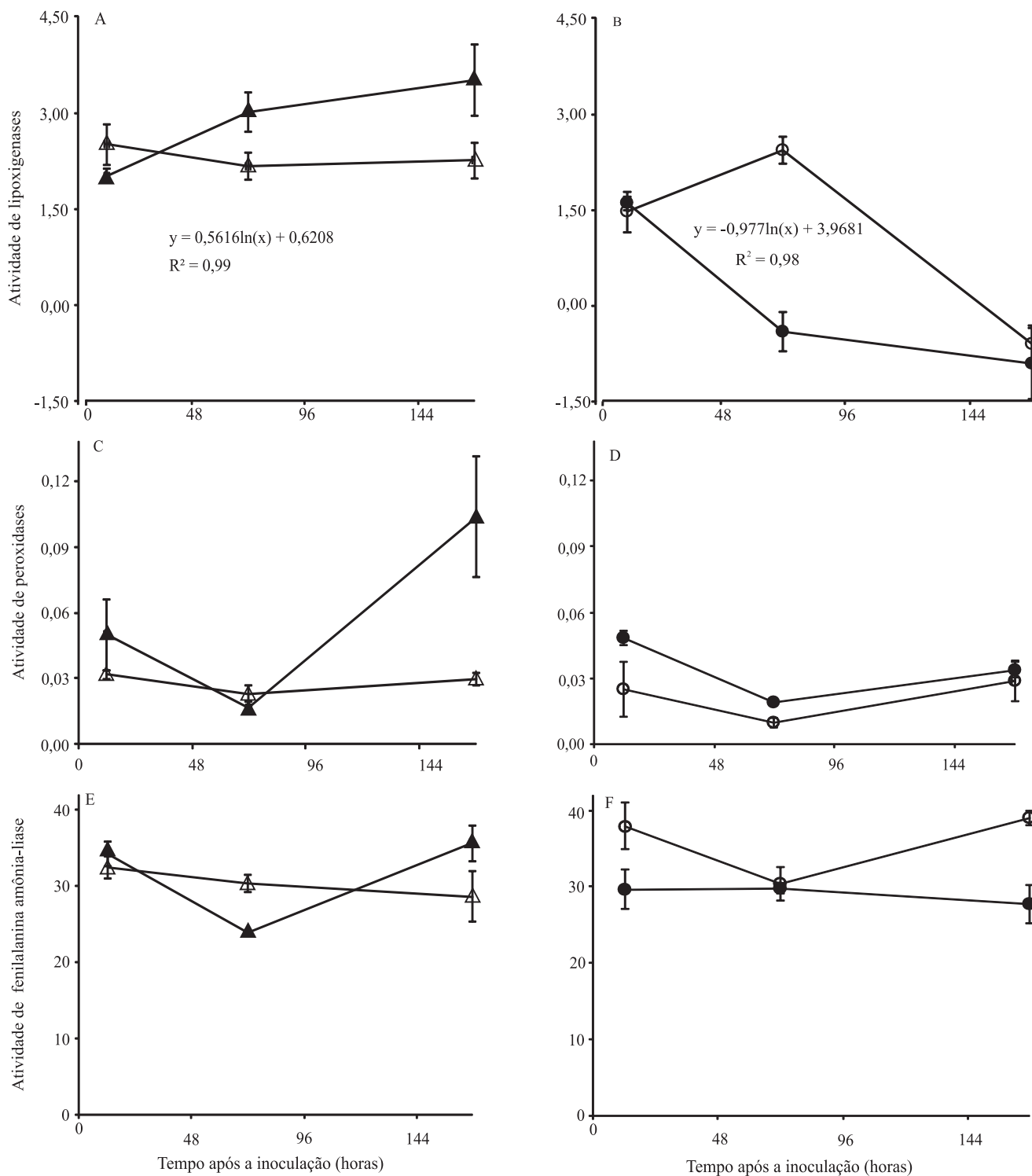
A proteína total nos extratos do genótipo Embrapa 48, avaliada às 12, 72 e 168 horas após a inoculação, apresentou tendência de ajuste a modelo exponencial, o que indica que aumentos na síntese de proteínas podem ser requeridos para o processo de defesa dessas plantas. No entanto, plantas do genótipo resistente PI 561356 apresentaram pouca alteração na concentração proteica ao longo do tempo, com tendência de decréscimo às 72 horas após a inoculação (Figura 1), o que é indicativo de eventos de defesa que envolvem baixa concentração proteica.

Plantas do genótipo Embrapa 48, submetidas ou não à inoculação, apresentaram alta atividade das lipoxigenases durante todo o período avaliado (Figura 2 A), o que indica a presença de formas constitutivas e induzidas da enzima. A inoculação promoveu aumento das lipoxigenases em plantas desse genótipo ao longo do tempo, com tendência a ajuste logarítmico positivo. Em PI 561356, de forma inversa, as atividades de lipoxigenases decresceram entre 12 e 168 horas após a inoculação (Figura 2 B), o que é indicativo da desativação da via que envolve lipoxigenases ativas a pH 6,0, condição observada no presente trabalho. Cabe ressaltar que formas ativas da enzima em outros valores de pH poderiam estar presentes e não terem sido detectadas. O conjunto de lipoxigenases em folhas de soja é pouco conhecido, envolve diversos genes e varia com o genótipo e o estágio de desenvolvimento das plantas (Baracat-Pereira et al., 2001; Baysal & Demirdoven, 2007).

Plantas do genótipo PI 561356 não submetidas à inoculação podem ter desativado a via das lipoxigenases ativas a pH 6,0, por meio da ação de compostos voláteis produzidos por plantas submetidas à inoculação, como resposta de defesa. De acordo com Liavonchanka & Feussner (2006), os compostos voláteis de plantas, como álcoois, éteres e aldeídos de folhas, produzidos por várias enzimas, inclusive lipoxigenases, são considerados compostos de sinalização para a defesa. Porta & Rocha-Sosa (2002) relataram que diferentes compostos voláteis produzidos por folhas de plantas infestadas ou plantas feridas podem ser detectados por plantas vizinhas, que respondem de forma diferenciada para sua defesa.



**Figura 1.** Proteína total dos extratos de folhas de soja dos genótipos Embrapa 48 (A) e PI 561356 (B) às 12, 72 e 168 horas após inoculação (símbolos cheios) ou não (símbolos vazios) com *Phakopsora pachyrhizi*. A determinação foi feita por meio do método de Bradford (1976), ajustado para microquantidades. As barras indicam desvio-padrão, para três replicatas, e as equações referem-se às regressões para os resultados das plantas que receberam inoculação.



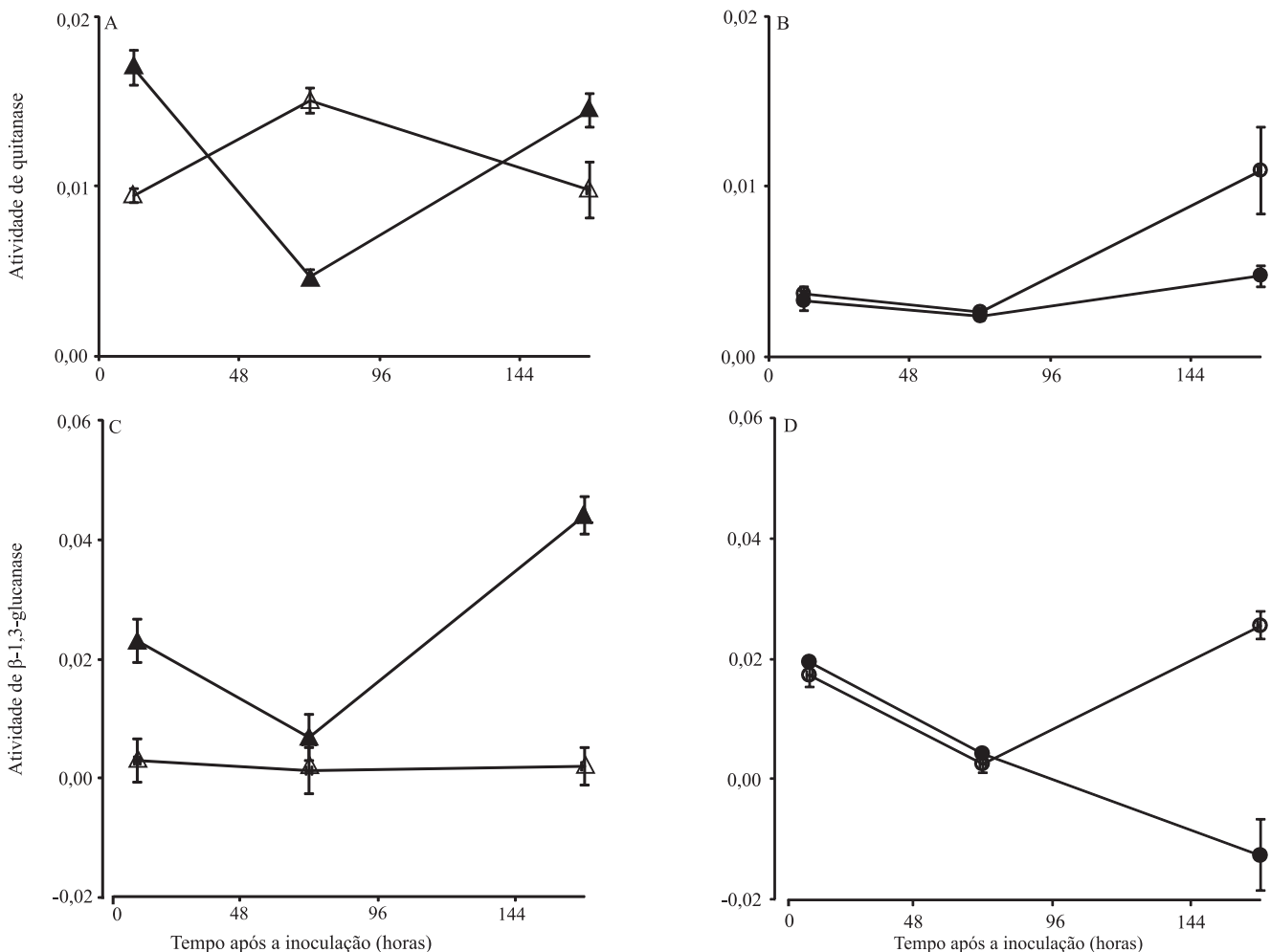
**Figura 2.** Atividade específica de lipoxigenases ( $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido do ácido linoleico por minuto por micrograma de proteína, A e B), peroxidases ( $\Delta\text{A}470$  por minuto por micrograma de proteína, C e D) e fenilalanina amônia-liase (nanomol de ácido cinâmico por minuto por micrograma de proteína, E e F), em extratos de folhas de soja dos genótipos Embrapa 48 (A, C e E) e PI 561356 (B, D e F), às 12, 72 e 168 horas após inoculação (símbolos cheios) ou não (símbolos vazios) com *Phakopsora pachyrhizi*. As barras indicam desvio-padrão, para três replicatas. Em A e B, as equações referem-se às regressões para os resultados das plantas que receberam inoculação.

Os resultados obtidos no presente trabalho com o genótipo PI 561356 não corroboram os de Choi et al. (2008), que relataram aumento da expressão dos genes que codificam para lipoxigenases, em plantas de soja do genótipo PI 200492, o que foi mantido às 1, 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com *P. pachyrhizi*. De modo geral, plantas do genótipo PI 561356 possivelmente desativaram os mecanismos de lipoxigenases após a inoculação para dar lugar a mecanismos de defesa efetivos em menores concentrações proteicas.

Às 12 horas após a inoculação, a atividade de peroxidases foi maior nas plantas submetidas à inoculação em ambos os genótipos, em comparação ao controle (Figura 2 C e D), o que indica a participação de peroxidases em respostas de defesa iniciais, rápidas

e transientes. Às 168 horas após a inoculação, a atividade de peroxidases foi cerca de quatro vezes a do controle para Embrapa 48 (Figura 2 C), mas similar à do controle para PI 561356 (Figura 2 D). Em ambos os genótipos, esses resultados estão de acordo com os de proteína total (Figura 1) e também com os de atividade de lipoxigenases (Figura 2 A e B). A função biológica desempenhada pelas peroxidases corrobora essa observação, pois a via das lipoxigenases dá origem a radicais reativos, e a presença simultânea de lipoxigenases e peroxidases auxilia na proteção da célula contra possíveis danos pelos radicais formados.

Os resultados observados para Embrapa 48 estão em concordância com os de Choi et al. (2008), que verificaram que lipoxigenases e peroxidases



**Figura 3.** Atividade específica de quitinasas ( $\Delta A575$  por dia por grama de quitina por micrograma de proteína, A e B) e  $\beta$ -1,3-glucanases ( $\Delta A410$  por minuto por micrograma por proteína, C e D), em extratos de folhas de soja dos genótipos Embrapa 48 (A e C) e PI 561356 (B e D), às 12, 72 e 168 horas após inoculação (símbolos cheios) ou não (símbolos vazios) com *Phakopsora pachyrhizi*. As barras indicam desvio-padrão, para três replicatas.

desempenham papéis importantes na capacidade da célula hospedeira em resistir a infecções. Atividades aumentadas e simultâneas dessas enzimas foram descritas após desafios em diversos patossistemas, como em parede celular de raízes de plantas de soja infectadas ou não por *Phytophthora sojae*, em que lipoxigenases e peroxidases foram identificadas por espectrometria de massa (Mithöfer et al., 2002); em plantas de tomates submetidas à inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Silva et al., 2004); e em plantas de soja submetidas à inoculação de bactérias antagonistas e com o fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina* (Choudhary, 2011).

A atividade das peroxidases frequentemente aumenta em resposta a estresses (Resende et al., 2003), pois elas são glicoproteínas antioxidantes, capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou a catálise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a formação de lignina, o catabolismo de auxinas e a cicatrização de ferimentos. Choi et al. (2008), em estudos transcriptômicos de plantas de soja do genótipo PI 200492, verificaram maior expressão dos genes que codificam para peroxidases ao longo das 48 horas após inoculação de *P. pachyrhizi*, semelhantemente ao observado no presente trabalho para Embrapa 48. Entretanto, os resultados obtidos para o genótipo PI 561356 indicam a presença de outros mecanismos de defesa alternativos à atividade de peroxidases.

A alta atividade de fenilalanina amônia-liase observada nos dois genótipos e em todos os tempos avaliados (Figura 2 E e F) é indicativa da expressão constitutiva de metabólitos secundários de origem fenólica, essenciais à estrutura celular. O genótipo Embrapa 48 não submetido à inoculação e o PI 561356 submetido à inoculação apresentaram atividade constante de fenilalanina amônia-liase ao longo do período avaliado, o que indica que as plantas de PI 561356 não responderam ao desafio pelo fungo nos tempos avaliados. Para as plantas do genótipo Embrapa 48 submetidas à inoculação, a maior atividade de fenilalanina amônia-liase em 168 horas após inoculação (Figura 2 E) é indicativo de resposta de indução de resistência, conforme Pregelj et al. (2011). A fenilalanina amônia-liase gera precursores de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção, como a lignina. Porém, em plantas do genótipo PI 561356 não submetidas à inoculação (Figura 2 F), as maiores atividades de fenilalanina amônia-liase

observadas às 12 e 168 horas após a inoculação poderiam ser decorrentes da ativação por compostos voláteis originados inicialmente das reações de defesa iniciais ou da ativação pelos próprios metabólitos da fenilalanina amônia-liase (Pregelj et al., 2011). Essa enzima está envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanoides, com a conversão de fenilalanina em ácido-trans-cinâmico, o que resulta em compostos como as fitoalexinas e, principalmente, lignina, que conferem resistência à parede celular e atuam como sinalizadores e em respostas de defesa. A fenilalanina amônia-liase atua na biossíntese, na regulação da síntese de compostos fenólicos (Gerasimova et al., 2005) e em respostas a estresses bióticos e abióticos.

Mozzetti et al. (1995) também não observaram diferenças nas atividades de fenilalanina amônia-liase em folhas de pimenta inoculadas ou não com *P. capsici* e *P. parasitica*. De acordo com estes autores, algumas poucas células infectadas estariam circundadas por tecido saudável, o que poderia não levar à ativação de enzimas relacionadas à resistência a patógenos.

À semelhança de peroxidases (Figura 2 C) e fenilalanina amônia-liase (Figura 2 E), as maiores atividades de quitinases (Figura 3 A) e de  $\beta$ -1,3-glucanases (Figura 3 C) em Embrapa 48 ocorreram às 12 e 168 horas após a inoculação, quando comparadas aos controles. Isso indica resposta inicial e transiente ao fungo às 12 horas e resposta tardia às 168 horas, o que poderia ser atribuído a compostos voláteis ou a metabólitos gerados anteriormente. Esses resultados estão de acordo com o mecanismo de defesa bifásica proposto por Mortel et al. (2007) e com os resultados de Schneider et al. (2011). Nos controles do genótipo Embrapa 48, a alta atividade de quitinases (Figura 3 A) e a baixa atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (Figura 3 C) ao longo do período avaliado indicaram síntese constitutiva de quitinase, com maior indução dessa enzima às 72 horas, possivelmente por voláteis sintetizados preliminarmente. Para plantas do genótipo PI 561356 inoculadas, as atividades de quitinases (Figura 3 B) e de  $\beta$ -1,3-glucanases (Figura 3 D) foram menores do que as do controle apenas às 168 horas após a inoculação, o que reforça a ocorrência de menor atividade de enzimas de defesa nesse período.

A superexpressão de genes de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em plantas tem aumentado a resistência das plantas a patógenos (van Loon et al., 2006). As quitinases hidrolisam a quitina da parede

celular de fungos e prejudicam o desenvolvimento dos microrganismos e, conseqüentemente, atuam na defesa contra patógenos e a estresses abióticos. Já as  $\beta$ -1,3-glucanases degradam  $\beta$ -glucanas, componente abundante da parede celular de muitos patógenos (Wu & Bradford, 2003). Aumentos nos níveis de quitinases por agentes abióticos (etileno, ácido salicílico, luz ultravioleta) e bióticos (fungos, bactérias, vírus, componentes de parede celular de fungos e oligossacarídeos) também têm provado sua função na defesa de plantas, inclusive em soja (Graham et al., 2003). A infecção de plântulas de soja por *P. megasperma* f. sp. *glycinea* aumentou significativamente a síntese e o acúmulo de  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases (Yi & Hwang, 1996).

Campos et al. (2009) observaram maiores atividades de  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases em plantas de feijão de quatro cultivares, três dias após aspersão de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum* avirulento. Houve correlação significativa entre o índice de severidade da doença causada por um patótipo virulento e a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases, cinco dias após a inoculação. A severidade da doença foi reduzida em plantas previamente tratadas com *C. lindemuthianum* avirulenta. Em mamoeiros, a indução de resistência à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos também foi constatada pelos incrementos nas atividades de peroxidases e  $\beta$ -1,3-glucanases, e pela maior concentração de lignina em comparação à testemunha, após pulverização das plantas com fungicidas com indutores abióticos não fungicidas e com o indutor biótico *Saccharomyces cerevisiae*, três e seis dias antes da pulverização de zoósporos de *P. palmivora* (Tavares et al., 2009).

Na análise das enzimas de indução de resistência expressas, de modo geral, os resultados obtidos para o genótipo Embrapa 48 corroboram os relatados na literatura, quando a indução de resistência envolve a ativação de genes que codificam um conjunto de enzimas que são membros das proteínas PR (van Loon, 1997). Essas proteínas PR englobam famílias com características variadas, mas apresentam, em comum, o fato de estarem relacionadas à defesa durante a patogênese. Assim, essas proteínas apresentam potencial para exploração em programas de indução de proteção em plantas (van Loon, 1997).

Para o genótipo PI 561356, em geral, não foram observados aumentos de atividade pela inoculação

com o fungo, como comumente relatado na literatura. Deve-se considerar a hipótese de que o genótipo PI 561356 pode apresentar alterações em isoformas dessas enzimas, não detectáveis ou mensuráveis sob as condições analisadas. Sabe-se que a síntese e a atividade das isoformas de enzimas presentes nas plantas variam quantitativa e qualitativamente de acordo com a espécie, o tecido vegetal, o estágio fisiológico e a influência do ambiente, por fatores como incidência de luz, temperatura, pH ou qualquer outro tipo de estresse. Entretanto, é importante ressaltar que houve cultivo simultâneo e sob condições homogêneas de todas as plantas analisadas no presente trabalho, em ambos os genótipos.

Uma hipótese para as menores atividades dessas enzimas após a inoculação das plantas, no genótipo PI 561356, diferentemente do observado para Embrapa 48, pode estar relacionada à sinalização desencadeada por compostos voláteis previamente produzidos por respostas de defesa nas plantas inoculadas, antes de 12 horas. Esses compostos voláteis são descritos como sinais de defesa reconhecidos por receptores de membranas, que respondem por meio de amplificação de sinais. Esses mecanismos de amplificação de respostas geralmente requerem baixas concentrações proteicas e podem gerar respostas mais efetivas e menos transitórias do que a síntese de enzimas de indução de resistência. Relatos diversos apontam para similaridades entre rotas de sinalização que iniciam as respostas de defesa em plantas e animais, quando mecanismos como cascatas de resposta são ativados. Embora não haja conhecimento de nenhum relato para esse patossistema ou similar, em estudos de infecção por *Ralstonia solanacearum* em tomate (Chen et al., 2009), observou-se que o silenciamento de proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPKs), que participam em cascatas de respostas, promoveu aumento significativo na proliferação bacteriana e da doença, o que confirmou o envolvimento da quinase na cascata de resposta. Do mesmo modo, o silenciamento das vias de transdução de sinal pelo etileno e pelo ácido salicílico também favoreceu a doença.

## Conclusões

1. Os mecanismos de defesa dos genótipos de soja PI 561356 (resistente) e Embrapa 48 (suscetível) contra a ferrugem-asiática-da-soja diferem em resposta



à inoculação das plantas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, quando avaliados às 12, 72 e 168 horas após inoculação, por meio das atividades de enzimas marcadoras de indução de resistência.

2. O genótipo Embrapa 48 apresenta aumento nas atividades das cinco enzimas marcadoras de indução de resistência avaliadas como resposta de defesa induzida pelo fungo *P. pachyrhizi*, enquanto o genótipo PI 561356, em geral, apresenta decréscimos nas atividades dessas enzimas.

3. Há um importante mecanismo de resistência utilizado pelo genótipo PI 561356, ainda não relatado, que está embasado nas atividades das cinco enzimas avaliadas e em mecanismos que não alterem expressivamente a concentração de proteína total, como os de respostas geradas por vias de sinalização em cascata.

### Agradecimentos

À Embrapa Soja, pela concessão do material vegetal; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, à Financiadora de Estudos e Projetos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas; e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilização de infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

### Referências

- BARACAT-PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.G. de A.; BARROS, E.G. de; MOREIRA, M.A.; SANTORO, M.M. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.91-98, 2001.
- 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. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.491-496, 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.248-254, 1976.
- CAMPOS, Â.D.; HAMPE, M.M.V.; FERREIRA, A.G.; ANTUNES, I.F.; CASTRO, L.A.S. de. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.15-21, 2009.
- CHEN, Y.-Y.; LIN, Y.-M.; CHAO, T.-C.; WANG, J.F.; LIU, A.C.; HO, F.I.; CHENG, C.P. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. **Physiologia Plantarum**, v.136, p.324-335, 2009.
- 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 lipoxygenases. **Functional and Integrative Genomics**, v.8, p.341-359, 2008.
- CHOUDHARY, D.K. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology Letters**, v.33, p.2287-2295, 2011.
- GERASIMOVA, N.G.; PRIDVOROVA, S.M.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. Role of L-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.41, p.103-105, 2005.
- GRAHAM, M.Y.; WEIDNER, J.; WHEELER, K.; PELOW, M.J.; GRAHAM, T.L. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.63, p.141-149, 2003.
- HACKMAN, R.H.; GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, v.8, p.397-401, 1964.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.
- LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.348-357, 2006.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. da 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 cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.34-37, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cultura – soja**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 11 mar. 2011.
- MITHÖFER, A.; MÜLLER, B.; WANNER, G.; EICHACKER, L.A. Identification of defence-related cell wall proteins in *Phytophthora sojae*-infected soybean roots by ESI-MS/MS. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.163-166, 2002.
- MORTEL, M. van de; RECKNOR, J.C.; GRAHAM, M.A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J.D.; NELSON, R.T.; GODOY, C.V.; ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA, A.M.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response

- to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p.887-899, 2007.
- MOZZETTI, C.; FERRARIS, L.; TAMIETTI, G.; MATTA, A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.95-107, 1995.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature**: recommendations of the nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. London: Queen Mary University of London, 2011. Available at: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Accessed on: 09 Dec. 2011.
- PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v.115, p.165-172, 1986.
- PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxygenases: physiological and molecular features. **Plant Physiology**, v.130, p.15-21, 2002.
- PREGELJ, L.; MCLANDERS, J.R.; GRESSHOFF, P.M.; SCHENK, P.M. Transcription profiling of the isoflavone phenylpropanoid pathway in soybean in response to *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Functional Plant Biology**, v.38, p.13-24, 2011.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.L.M.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.
- SCHNEIDER, K.T.; MORTEL, M. van de; BANCROFT, T.J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R.T.; FREDERICK, R.D.; BAUM, T.J.; GRAHAM, M.A.; WHITHAM, S.A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlates with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**, v.157, p.355-371, 2011.
- 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.
- TAVARES, G.M.; LARANJEIRA, D.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, T.R.; PIROVANI, C.P.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1416-1423, 2009.
- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.
- 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.
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J.J. Epidemics of soybean rust (*Pakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v.89, p.675-677, 2005.

---

Recebido em 14 de março de 2011 e aprovado em 9 de janeiro de 2012