**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies*
na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***

Samuel de Paula

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2019**

Samuel de Paula
Bacharel em Agronomia

**Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na
indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Paula, Samuel de

Textomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi* / Samuel de Paula. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

99 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ferrugem da soja 2. Indução de resistência 3. Textomina 4. Controle
I. Título

DEDICATÓRIA

À Deus

Pela certeza de nunca estar sozinho nesta longa caminhada.

Aos meus pais,

João Adelino de Paula e Néva Demartini de Paula

Pelo apoio diário e incondicional, mesmo que a distância, e por sempre terem
dispensado a mim todo o incentivo para seguir este caminho!

Ao meu irmão e minha cunhada,

Kaciano de Paula e Adriane Reis

Pelo grande apoio e por sempre estarem à disposição para auxiliar em tudo!

À minha namorada,

Aline Fachin Martíni

Pelo suporte diário, compreensão em todos os momentos e pelo grande
companheirismo!

A todos vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu grande protetor e que me concede as graças diárias para seguir neste caminhada.

Agradeço, em especial, ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pelo conhecimento repassado, compreensão, dedicação e por sua admirável forma de conduzir o convívio e a pesquisa com seus orientados.

Ao Laboratório de Produção de Sementes (ESALQ/USP), especialmente a Prof^a Dra. Ana D. L. Novembre pelas sugestões e disponibilização do espaço para a realização das análises.

Aos meus pais, João Adelino de Paula e Néva Demartini de Paula, ao meu irmão, Kaciano de Paula e a minha cunhada, Adriane Reis, por apoiarem as minhas decisões incondicionalmente e por sempre me auxiliarem em tudo o que precisei.

À minha namorada, Aline Fachin Martíni, por todo o auxílio, compreensão e atenção dispensados a mim. E, por entender minha ausência em muitos momentos importantes. Muito obrigado!

Aos colegas de laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Victor Hugo Moura de Souza, Dayson Fernando Ribeiro Brandão, Wesler Luiz Marcelino, Daniel Baumgartner Mendes Grossi, Ruan Carlos Navarro Furtado, Janaína Barreta, Andressa Lopes, Suzani Paz, Sabrina Holz, Tainara Menegassi, Mônica Mieko Nakanishi Tamura, Angélica Luana Carrillo Barra, Yuri Sarreta Oda, Ronaldo José Durigan Dalio e Rafaela Carolina Constantino Roma Almeida pela amizade e pelo excelente convívio em nosso ambiente de trabalho.

Aos amigos mestrandos e doutorandos do programa pela amizade e boas conversas.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, especialmente a Fabiana Wolak, por estar sempre disposta a ajudar.

À Stoller do Brasil LTDA, pelo financiamento do projeto e pela disponibilização da área para a realização do experimento de campo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

EPIÍGRAFE

*“O insucesso é apenas uma oportunidade
para recomeçar com mais inteligência.”.*

Henry Ford

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. A cultura da soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.].....	19
2.2. Ferrugem Asiática da Soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	20
2.3. Indução de resistência	25
2.4. A fitotoxina taxtomina	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Obtenção de plantas de soja	33
3.2. Obtenção e manutenção do inóculo de <i>P. pachyrhizi</i>	33
3.3. Produção e preparo dos agentes utilizados nos tratamentos	34
3.3.1. Controle negativo	34
3.3.2. Meio aveia sem <i>Streptomyces scabies</i>	34
3.3.3. Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado e não autoclavado	34
3.3.4. Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	35
3.3.5. Taxtomina parcialmente purificada	35
3.3.6. Acibenzolar-S-metílico	36
3.3.7. Fungicida.....	36
3.4. Experimentos realizados	36
3.4.1. Avaliação do efeito direto <i>in vitro</i> dos agentes sobre urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	36
3.4.2. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada na germinação de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	37
3.4.3. Efeito da taxtomina parcialmente purificada sobre urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas destacadas.....	38
3.4.4. Efeito de diferentes preparações de potenciais indutores de resistência aplicados em folhas destacadas, no controle de <i>P. pachyrhizi</i>	39
3.4.5. Efeito dos diferentes tratamentos na severidade e respostas bioquímicas de plantas de soja à <i>P. pachyrhizi</i> , em condições de casa de vegetação	40

3.4.5.1. Análises bioquímicas.....	41
3.4.5.1.1. Preparo do extrato enzimático	41
3.4.5.1.2. Quantificação de proteínas totais.....	41
3.4.5.1.3. Atividade de guaiacol peroxidase.....	42
3.4.5.1.4. Quantificação de fenóis livres e ligados	42
3.4.6. Efeito da aplicação de diferentes potenciais indutores de resistência contra <i>P. pachyrhizi</i> em soja, em condições de campo.....	43
3.4.6.1. Preparo da área e semeadura	43
3.4.6.2. Aplicação dos tratamentos.....	43
3.4.6.3. Parâmetros avaliados	44
3.4.6.3.1. Severidade	44
3.4.6.3.2. Produtividade.....	44
3.4.6.3.3. Teste de uniformidade (retenção) e qualidade fisiológica de sementes	45
3.4.6.3.3.1. Teste de retenção em peneiras	45
3.4.6.3.3.2. Germinação.....	45
3.4.6.3.3.3. Envelhecimento acelerado	45
3.4.7. Obtenção do fator de retenção (R_f) da taxtomina purificada através de cromatografia de camada delgada (TLC)	46
3.4.8. Efeito da aplicação de taxtomina parcialmente purificada (TPP) e taxtomina purificada (TPU) na expressão gênica em plantas de soja.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Avaliação do efeito direto <i>in vitro</i> dos agentes sobre urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	49
4.2. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada na germinação de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	52
4.3. Efeito da taxtomina parcialmente purificada sobre urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas destacadas	53
4.4. Efeito de diferentes preparações de potenciais indutores de resistência aplicados em folhas destacadas, no controle de <i>P. pachyrhizi</i>	55
4.5. Efeito dos diferentes tratamentos na severidade e respostas bioquímicas de plantas de soja à <i>P. pachyrhizi</i> em condições de casa de vegetação.....	58
4.5.1. Severidade	58
4.5.2. Atividade de guaiacol peroxidase.....	63
4.5.3. Quantificação de fenóis livres e ligados	67

4.6. Efeito da aplicação de diferentes potenciais indutores de resistência contra <i>P. pachyrhizi</i> em soja, em condições de campo	71
4.6.1. Severidade e produtividade	71
4.6.2. Teste de retenção em peneiras	73
4.6.3. Germinação	75
4.6.4. Envelhecimento acelerado	76
4.7. Obtenção do fator de retenção (R_f) de taxtamina purificada através de cromatografia de camada delgada (TLC).....	78
4.8. Monitoramento da resposta de plantas de soja à aplicação de taxtamina parcialmente purificada e taxtamina purificada através da expressão de genes ligados a resistência	79
5. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES.....	99

RESUMO

Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi*

Atualmente a ferrugem-asiática da soja é a doença mais importante da cultura e desde o seu surgimento vem causando diversos prejuízos. Devido a sua importância, faz-se necessário buscar alternativas que possam contribuir com o manejo tradicional com fungicidas. Neste sentido, surge a indução de resistência como uma alternativa para o seu controle. Dentre os indutores de resistência, as fitotoxinas apresentam potencial como ativadoras de plantas e neste caso, mais especificamente a taxtomina, produzida por *Streptomyces scabies*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da fitotoxina taxtomina parcialmente purificada (TPP) e preparações de *Streptomyces scabies* como potenciais indutores de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi*. Foram realizados ensaios para avaliar o efeito direto dos potenciais indutores de resistência a base de suspensão de células de *Streptomyces scabies*, filtrado de meio de cultivo de *Streptomyces scabies*, TPP e acibenzolar-S-metílico sobre a germinação de urediniósporos através do teste de microgotas em placas de Petri de poliestireno. Também foram realizados ensaios em folha destacada, onde fez-se a aplicação dos potenciais indutores e depois de determinado tempo fez-se a inoculação com *P. pachyrhizi*, sendo posteriormente avaliado o potencial dos compostos na redução da severidade. Ensaios em casa de vegetação foram conduzidos com plantas de soja que receberam a aplicação dos indutores e, posteriormente, foram inoculadas, onde avaliou-se a redução da severidade. Em casa de vegetação também foram conduzidos experimentos para a coleta de amostras para a realização de análises bioquímicas como peroxidase e fenóis, visando monitorar a atividade e o acúmulo de compostos relacionados a defesa de plantas a patógenos. Ensaio de campo foi realizado para verificar o potencial em reduzir a severidade da ferrugem da soja, onde foi avaliada a produtividade e a qualidade fisiológica das sementes produzidas. A expressão de genes relacionados as vias de defesa como resposta a aplicação de taxtomina também foi monitorada. Como resultados, observou-se que a TPP tem efeito direto sobre urediniósporos de *P. pachyrhizi*, inibindo a germinação em 61 %. A TPP reduziu a severidade da doença em folha destacada, mas não em plantas em condições de casa de vegetação. A TPP também aumentou a atividade de peroxidase e alterou o acúmulo de fenóis ligados. Em condições de campo, apenas o tratamento com fungicidas reduziu a severidade da doença. Nenhum dos tratamentos utilizados afetou a germinação e o vigor das sementes produzidas. A TPP foi capaz de alterar a expressão gênica e regular positivamente o gene ACC, envolvido na síntese do etileno. Conclui-se que a TPP apresenta, além de efeito direto sobre o patógeno, potencial para alterar compostos e a expressão de genes relacionados as vias de defesa das plantas.

Palavras-chave: Ferrugem-asiática da soja; Indução de resistência; Soja; Controle alternativo

ABSTRACT

Partially purified thaxtomin and *Streptomyces scabies* preparation in the induction resistance in soybean plants to *Phakopsora pachyrhizi*

Asian soybean rust is the most important disease of the crop today and since its inception has caused several damages. Due to its importance, it is necessary to look for alternatives that can contribute to the traditional management with fungicides. In this sense, induction of resistance appears as a promising alternative for the control of diseases. Among the resistance inducers, phytotoxins have the potential as plant activators and in this case, more specifically thaxtomin, produced by *Streptomyces scabies*. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of the partially purified phytotoxin thaxtomin (TPP) and preparation of *Streptomyces scabies* as potential inducers of resistance in soybean to *Phakopsora pachyrhizi*. For this, tests were carried out to evaluate the direct effect of potential resistance inducers on the germination of urediniospores through the test of microdrops on polystyrene Petri dishes. Detached leaf assay also carried out, where the potential inducers were applied and after a certain time the inoculation with *P. pachyrhizi* was done, being evaluated the potential of the compounds in reducing the severity. Greenhouse tests were also carried out with soybean plants that received the application of the inducers and later inoculated, where the reduction of severity was evaluated. Greenhouse experiments were also carried out for the collection of samples for biochemical analyzes such as peroxidase and phenolic compounds, aiming to monitor the activity and the accumulation of compounds related to plant defense to pathogens. In addition, preliminary field trials were carried out to verify the potential of the inducers in reducing the severity of soybean rust, where the productivity and physiological quality of the seeds were also evaluated. Expression of genes related to the defense pathways as a response to thaxtomin application was also monitored. As results, it was observed that the partially purified thaxtomin had a direct effect on *P. pachyrhizi* urediniospores, inhibiting germination by 61%. In addition, it was also able to reduce the severity in detached leaves but not in seedlings under greenhouse conditions. Partially purified thaxtomin was also able to increase peroxidase activity and alter the accumulation of bound phenols. At field conditions, only the treatment that used fungicides was able to reduce the severity of the disease. However, although only one of the treatments reduced the disease, none of the treatments used was able to affect the germination and vigor of the seeds produced. Finally, the partially purified thaxtomin was able to alter gene expression and positively regulate the ACC gene, that is involved in ethylene metabolism. In general, it is concluded that TPP has, in addition to a direct effect on the pathogen, potential to alter plant defense related compounds and the expression of genes related to defense pathways.

Keywords: Asian soybean rust; Resistance induction; Soybean; Alternative control

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Folha de soja apresentando sintomas causados pela infecção, colonização e reprodução de *P. pachyrhizi* demonstrando a formação de urédias na parte abaxial 20 dias após a inoculação.....21
- Figura 2: Ciclo de vida de *P. pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja ocasionada por *P. pachyrhizi*. Ciclo construído baseado em: ¹Bonde et al. 1976; ⁴Yeh 1981; ³Reis et al. 2006; ²Zambenedetti et al. 2007; ⁵Garcés et al. 2010. Crédito do infográfico: Marcelo Madalosso – Instituto Phytus23
- Figura 3: Genes relacionados a ácido salicílico, jasmonato, etileno, genes R, explosão oxidativa, fisiologia e reprodução. Adaptado de Dalio et al. (2018).....29
- Figura 4: Estrutura da molécula da fitotoxina taxtomina A (C₂₂H₂₂N₄O₆), produzida por *Streptomyces scabies*. Crédito da imagem: PubChem30
- Figura 5: Caixa construída para a manutenção de plantas de soja utilizadas como fonte de inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* com umidade mantida por umidificador instalado lateralmente.33
- Figura 6: Placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro saturadas com água e duas lâminas simples de microscopia, sobre as quais o folíolo de soja foi acomodado e ao seu pecíolo adicionado um pequeno chumaço de algodão.39
- Figura 7: Urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* com a germinação inibida (A) em função da aplicação de fungicida (3,33 mL L⁻¹) e urediniósporos com germinação normal (B) no controle negativo (B). As setas indicam a presença de tubo germinativo (TG) e apressório (AP).51
- Figura 8: Percentual de germinação *in vitro* de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em função de concentrações crescentes de taxtomina parcialmente purificada.....52
- Figura 9: Severidade em folhas destacadas de soja 12 dias após a inoculação com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* previamente tratados com o controle negativo e taxtomina parcialmente purificada em diferentes intervalos de tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste t-Student a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.54
- Figura 10: Formação de pústulas em folhas de soja destacadas observada 12 dias após a inoculação com suspensão de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* submetidos ao controle negativo e a taxtomina parcialmente purificada (200 µg equiv. mL⁻¹) durante intervalos de tempo de 50 minutos (A e B) e 90 minutos (C e D), respectivamente.54

Figura 11: Lesões de ferrugem-asiática em folhas destacadas de soja submetidas ao controle negativo (A), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavado (B), filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies* (C), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado (D), meio-aveia sem *Streptomyces scabies* (E), acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (F), taxtomina parcialmente purificada ($100 \text{ } \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) (G) e Picoxistrobina + Benzovindiflupir ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$) (H) 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *P. pachyrhizi*. 58

Figura 12: Severidade em trifólios de plantas após a aplicação dos tratamentos e inoculação com suspensão de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. A coluna azul representa os dados obtidos no Experimento I, enquanto que a coluna vermelha representa os dados obtidos no Experimento II. A taxtomina parcialmente purificada foi utilizada na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$. Os tratamentos dentro de cada experimento seguidos pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ 59

Figura 13: Lesões de ferrugem-asiática em trifólios de soja coletados dos experimentos I e II, os quais foram submetidos ao controle negativo (A), taxtomina parcialmente purificada ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) (B), acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (C) e fungicida ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$) (D) 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. 63

Figura 14: Atividade de guaiacol peroxidase quantificada em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ 66

Figura 15: Acúmulo de fenóis livres quantificado em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ 69

Figura 16: Acúmulo de fenóis ligados quantificado em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ 70

Figura 17: Desfolha de plantas de soja observada em condições de campo 88 dias após a semeadura em resposta a aplicação do controle negativo (A), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavada (B), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavada (C), filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies* (D); acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (E) e fungicidas (F) e a ocorrência de *P. pachyrhizi*. .. 73

Figura 18: Classificação física de sementes de soja através do teste de retenção em peneiras. Sementes colhidas em experimento realizado em condições de campo, onde as plantas foram submetidas a aplicação de seis tratamentos (controle, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavado, filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies*, Acibenzolar-S-metílico e fungicidas) durante o ciclo de cultivo. As sementes foram classificadas de acordo com 10 peneiras de diferentes diâmetros e os dados foram apresentados em porcentagem de retenção por peneira de cada tratamento. As barras representam o erro padrão..... 75

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ 77

Figura 19: Placa de cromatografia de camada delgada apresentando coeficiente de retenção (R_f) para a taxtomina purificada (TPU) visualizada em luz fluorescente (A) e no comprimento de onda no ultravioleta longo de 365 nm (B). A primeira linha (Início) representa onde a TPU e o controle (MET) foram depositados na placa e última linha (Fim) representa a distância percorrida pelo solvente na placa até a paralisação da corrida. A linha intermediária demonstra a distância percorrida pela TPU no solvente clorofórmio/metanol (9:1)..... 79

Figura 20: Alteração na expressão de genes ligados as vias de defesa e monitorados em folhas de plântulas de soja coletadas 24 horas após a aplicação foliar do tratamento controle, taxtomina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) e taxtomina purificada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em condições de casa de vegetação. Genes com valores superiores ao controle ($\cong 1,0$) foram considerados como regulados positivamente e genes com valores inferiores foram considerados como regulados negativamente. Genes com valores próximos a 1,0 não foram alterados..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de tratamentos e doses utilizados para os experimentos	36
Tabela 2: Tratamentos e concentrações utilizados para a verificação da redução da severidade e respostas bioquímicas.....	40
Tabela 3: Percentual de germinação e inibição da germinação de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> submetidos ao controle negativo, acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$), meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado e não autoclavado, filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i> , taxtomina parcialmente purificada ($100 \text{ } \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) e fungicida ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$).....	51
Tabela 4: Severidade, índice de esporulação e percentual de germinação de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em folhas destacadas de soja.	57
Tabela 5: Severidade da ferrugem-asiática, produtividade e redução da produtividade em plantas de soja em condições de campo como resposta a aplicação dos diferentes tratamentos.	72
Tabela 6: Germinação de sementes de soja (expressa em porcentagem de plântulas normais) colhidas de plantas submetidas a aplicação de potenciais indutores de resistência em condições de campo. Colheita realizada 105 dias após a semeadura.....	76
Tabela 7: Germinação de sementes de soja (expressa em porcentagem de plântulas normais) colhidas de experimento em condições de campo e submetidas ao teste de envelhecimento acelerado para a verificação do vigor. Colheita realizada 105 dias após a semeadura.....	77

1. INTRODUÇÃO

Juntamente com o aumento da população mundial, também aumentou a demanda de alimentos. Diante disso, em escala mundial, uma a cada nove pessoas não possui comida suficiente para ter uma vida ativa e saudável (Fao et al. 2014). Com as estimativas de crescimento da população, a elevação do consumo *per capita* e a expansão das cidades, aliados a restrição de uso de terras, as discussões sobre a incapacidade de suprir a demanda humana de alimentos tem chamado cada vez mais a atenção (Saath & Fachinello 2018). Conforme dados da ONU (2017), a população mundial deverá atingir 8,3 e 8,9 bilhões em 2030 e 2050, respectivamente.

Em se tratando da expansão da fronteira agrícola para suprir a demanda de alimentos, a mesma encontra-se consideravelmente restrita (Saath & Fachinello 2018). As possíveis novas áreas agrícolas encontram-se localizadas apenas em alguns países, sendo sua maioria situadas na América Latina e África-Subsaariana (Fao 2013). Deve-se considerar ainda que países como EUA e China não possuem novas áreas para exploração agrícola (Fao 2013). Nos EUA, só deverão ocorrer aumentos relacionados a produtividade através da produção de determinada *commodity* em detrimento de outra (Fiesp 2016). Além disso, recentes preocupações com o meio ambiente e a preservação de florestas nativas tem elevado o monitoramento da legalidade da exploração de novas áreas (Saath & Fachinello 2018). Tal fato torna-se importante a medida que a soja, por exemplo, um dos principais insumos para a produção de rações necessita de uma elevação de 2,6% no volume produzido no Brasil para suprir a demanda estimada (Saath & Fachinello 2018). Tal demanda exige que haja uma enorme expansão de área, se considerada uma produtividade constante (Saath e Fachinello 2018).

Diante dos problemas com a expansão da fronteira agrícola, o aumento da produtividade torna-se uma maneira necessária para aumentar a oferta de alimentos (Saath & Fachinello 2018). Essa mesma alternativa foi utilizada no período pós-revolução tecnológica no campo e possibilitou a elevação da oferta para além da demanda mundial de alimentos (Fao 2013).

Além da expansão da fronteira agrícola e da necessidade de elevação da produtividade, para atender a esta demanda, a agricultura vem contando com uma série de avanços. Tais avanços são alcançados principalmente através do melhoramento genético de cultivares, síntese de moléculas mais eficientes para o manejo fitossanitário e modernização na mecanização (Silveira et al. 2005). Dando maior enfoque para o manejo fitossanitário,

controlar doenças bióticas eficientemente pode ser um ponto decisivo quando se busca alcançar altas produtividades (Di Piero 2003).

O principal setor da economia brasileira é o agronegócio, correspondendo por mais de 25% do produto interno bruto (PIB), por 35% dos empregos brasileiros e 42% das exportações totais (Brasil 2011). A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma das culturas de maior interesse econômico para o Brasil e uma das principais responsáveis pelo fornecimento de proteínas para a alimentação humana e animal (Pereira et al. 2009a). Atualmente, o Brasil ocupa a segunda posição entre os produtores mundiais de soja, atrás apenas dos Estados Unidos. No entanto, no ano de 2001 aconteceu o primeiro relato de uma doença conhecida como ferrugem-asiática da soja (Yorinori et al. 2004), a qual de imediato já trouxe grandes prejuízos. O agente causal da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é um fungo biotrófico que se desenvolve muito bem em condições de molhamento foliar mínimo entre 6 e 12 horas e temperaturas variando entre 15 e 25 °C. Dissemina-se facilmente pelo vento, sob a forma de urediniósporos e se multiplica apenas em hospedeiros vivos (Duarte et al. 2009; Godoy et al. 2016b).

A forma de controle da ferrugem-asiática da soja mais difundida é a utilização do vazio sanitário na maioria das regiões produtoras do país e o escape pela utilização de cultivares precoces. A utilização de fungicidas também é uma ferramenta bastante difundida, entretanto, a adoção do controle químico como única ferramenta de manejo para as doenças deve ser evitado pelo potencial de surgimento de patógenos resistentes, além de elevar os custos de produção (Yorinori et al. 2004). Muitas vezes, o monitoramento inadequado, erros de aplicação e o controle tardio podem agravar ainda mais o cenário no que diz respeito ao manejo da ferrugem-asiática da soja.

A descoberta de produtos fitossanitários com modo de ação sistêmico contribuiu muito para o avanço do controle eficiente de doenças. Apesar deste avanço, atualmente o principal problema é a ocorrência de resistência do fungo *P. pachyrhizi* aos fungicidas e as mutações que vem sendo acumuladas por este patógeno, tornando os fungicidas menos eficientes. Outra estratégia utilizada é o uso de genes de resistência a raças específicas do patógeno, no entanto a falta de durabilidade desse tipo de resistência conduz a pesquisas sem fim. Por estes motivos, a indução de resistência tem chamado a atenção de diversos pesquisadores e também da iniciativa privada. Esta técnica dificilmente substituirá completamente os tradicionais fungicidas, mas pode auxiliar no manejo integrado de doenças (Di Piero 2003; Piccinin et al. 2005; Dallagnol et al. 2006).

Perante todos os entraves encontrados para o manejo desta doença, faz-se necessário buscar formas alternativas eficientes para o controle. Neste sentido, a indução de resistência surge como um método com potencial para controlar as doenças, caracterizando-se por atuar na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas como uma resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (Hammerschmidt & Dann 1997; Bonaldo et al. 2005; Pascholati & Dalio 2018a). Com a ocorrência desse fenômeno, a planta é capaz de expressar respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas que podem limitar a atividade do patógeno (Agrios 2005; Pascholati & Dalio 2018a). Determinados compostos com potencial eliciador ou que possam maximizar a ação de fungicidas devem ser estudados, pois possibilitam a realização de um manejo mais econômico e eficiente da *P. pachyrhizi* (Meneghetti et al. 2010).

A indução de resistência, resultado da ativação de mecanismos de defesa da planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos, vem ganhando importância como ferramenta no manejo integrado de doenças (Brand 2016). No meio comercial, um exemplo de sucesso envolvendo indutores de resistência é o do acibenzolar-S-metílico, Bion[®] (Syngenta), um produto que melhora a eficiência do controle e que já foi utilizado em conjunto com programas de controle químico (Dallagnol et al. 2006). Conforme já observado para a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), este indutor de resistência possui a capacidade de elevar a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase presentes em plantas, sendo que estas enzimas apresentam potencial para influenciar no controle de doenças (Pereira et al. 2009b). Tanto no meio científico como no comercial, a indução de resistência vem demonstrando sua eficiência na redução da incidência e/ou severidade de doenças (Cavalcanti et al. 2006; Sun et al. 2014).

Além do acibenzolar-S-metílico, outros compostos que possuem ação como indutores de resistência vem sendo estudados em diversos patossistemas, como a fitotoxina taxtomina A (Garcia et al. 2008b, a; Brand 2016)), produzida por *Streptomyces scabies*. As taxtominas pertencem a um grupo de fitotoxinas produzidas por microrganismos patogênicos do gênero *Streptomyces* (Beauséjour et al. 1999) e foram isoladas e caracterizadas primeiramente em 1992 (King et al. 1992), sendo associadas positivamente com a patogenicidade de *S. scabies* (King et al. 1991). A taxtomina A, particularmente, tem sua produção majoritária associada ao agente causal da sarna comum da batata (*S. scabies*) (Beauséjour et al. 1999). A produção desta fitotoxina *in vitro* já foi demonstrada por diversos autores em distintos meios de cultivo (Babcock et al. 1993; Loria 1995; Goyer et al. 1998).

Perante a possibilidade de produção *in vitro* da fitotoxina taxtomina A, diversas linhas de estudo começaram a serem exploradas, como as propriedades herbicidas deste composto (King et al. 2001) e também como ativador de defesa em plantas (Garcia et al. 2008b; Brand 2016). Em se tratando das propriedades herbicidas, destaca-se que as fitotoxinas taxtominas são capazes de causar a necrose celular de plantas com concentrações de mg mL^{-1} , todavia, o modo de ação ainda não está bem esclarecido (Loria et al. 1997; King et al. 2001). Quanto a ativação de defesa em plantas, a fitotoxina também demanda de baixas concentrações para expressar seu potencial, sendo necessárias doses em concentração de $\mu\text{g mL}^{-1}$ para que atue como eliciador na expressão dos mecanismos de defesa das plantas tratadas (Garcia 2008). As fitotoxinas apresentam capacidade de afetar processos metabólicos essenciais, além de atuarem no desencadeamento de mecanismos de defesas das plantas (Pascholati & Dalio 2018b).

Apesar do potencial da taxtomina A, este composto ainda não foi testado quanto a sua eficácia perante a ferrugem-asiática. Entretanto, com a crescente busca por métodos alternativos para o manejo integrado de doenças, as pesquisas envolvendo agentes de indução de resistência vem aumentando. No que diz respeito ao patossistema soja-*P. pachyrhizi*, pouco se sabe em relação aos mecanismos de defesa das plantas à infecção, demandando maiores estudos neste sentido (Mortel et al. 2007; Schneider et al. 2011).

Para tanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de taxtomina parcialmente purificada e preparações de *S. scabies* como potenciais indutores de resistência em plantas de soja a *P. pachyrhizi*, a fim de controlá-la. Os objetivos específicos envolveram: a) avaliar a ocorrência de efeito direto dos potenciais indutores sobre o patógeno; b) verificar o efeito dos potenciais indutores em condições de folha destacada, casa de vegetação e campo; c) avaliar os mecanismos bioquímicos alterados nas plantas de soja em resposta a aplicação dos potenciais indutores; e d) verificar a ativação do sistema de defesa das plantas através do monitoramento de genes específicos relacionados as vias de defesa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.]

A soja pertence a família Fabaceae e se tornou um dos principais produtos de exploração nacional após a expansão da cultura na década de 70 (Lazzarotto & Hirakuri 2010). Esta cultura tem como característica a emissão, a partir da semente, de um par de cotilédones seguido por um par de folhas unifoliadas. Em seguida, inicia a emissão das folhas ditas como verdadeiras, os trifólios, os quais encorpararão a planta durante o seu estágio vegetativo (Singh et al. 2007). Após, tem-se o início do estágio reprodutivo que compõe desde o período de início do florescimento até a maturação plena (Singh et al. 2007). O ciclo completo das cultivares de soja brasileiras tem duração que pode variar de 90 até 150 dias, dependendo da região e das características da cultivar semeada (Sediyama et al. 2015).

A estabilidade da economia nacional é dependente desta cultura, sendo que foi a que apresentou maior crescimento nas últimas três décadas (Fao 2017). Ainda segundo o mesmo autor, a evolução tecnológica viabilizou o grande progresso ocorrido no agronegócio brasileiro e, juntamente a este, elevou-se o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Brasil Central e a qualidade de vida. Pela sua reconhecida importância na alimentação humana e animal, a soja e seus subprodutos lideram o ranking do mercado externo, sendo a principal geradora de divisas cambiais (Brasil 2018). Esta marca é dependente da estabilidade da cultura, que pode ser afetada pelos diversos problemas que incidem sobre a mesma, entre estes a ocorrência de novas doenças e instabilidades climáticas. Dentre os variados fatores que afetam o potencial produtivo da cultura, estão as doenças que se destacam como principal fator limitante de incrementos em produtividade (Embrapa 2018).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial desta leguminosa e a produção da safra de 2017/2018 atingiu 110,16 milhões de toneladas, com uma área cultivada de aproximadamente 33,71 milhões de hectares (ha) e produtividade média de 3.268,00 kg ha⁻¹ (Conab 2017). Para a safra 2018/2019, estimativas mostram que o Brasil deve atingir uma produção entre 117 e 119,4 milhões de toneladas (Conab 2018). O maior potencial, no que se refere a expansão da área cultivada de soja, para os próximos anos está concentrado no Brasil, uma vez que este possui disponibilidade de área, além de condições tecnológicas, meteorológicas e topográficas favoráveis (Hirakuri & Lazzarotto 2014). Conforme estimativas, para a safra 2018/2019 está previsto um aumento de 2,9% da área semeada em relação a safra anterior, podendo ultrapassar os 36 milhões de hectares semeados (Conab 2018). Os maiores produtores nacionais de soja são os estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo que apenas sete estados em todo o território nacional não apresentam

produção de soja (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Conab 2018).

As perdas decorrentes da ocorrência de doenças têm aumentado (Yorinori et al. 2005), estimando-se que anualmente ocorrem perdas de cerca de 15 a 20% na produção (Embrapa 2000), sendo que a principal doença que afeta a sojicultura brasileira é a ferrugem-asiática da soja (Henning & Godoy 2006; Godoy et al. 2016b).

2.2. Ferrugem Asiática da Soja (*Phakopsora pachyrhizi*)

O primeiro relato da ferrugem-asiática da soja aconteceu no ano de 1902 no Japão e, posteriormente, em outros países da Ásia e da África (Sharma & Gupta 2006). O primeiro relato na América aconteceu no Havaí em 1994 e nos Estados Unidos da América em 2004 (Schneider et al. 2005). No ano de 2001 aconteceu os primeiros relatos da ferrugem-asiática da soja no Paraguai e Brasil, mais especificamente no estado do Paraná, onde disseminou-se amplamente, tendo um custo estimado de controle ao redor de US\$ 2 bilhões (Yorinori et al. 2005).

O agente causal da ferrugem-asiática da soja é um fungo biotrófico, ou seja, que necessita do hospedeiro vivo para sobreviver. Por isso a ocorrência de plantas espontâneas na lavoura, como resultado de sementes perdidas durante a colheita contribui para a sobrevivência do patógeno por um período maior na lavoura, podendo servir de fonte de inóculo para outras lavouras, razão pela qual estas plantas devem ser eliminadas (Fiallos 2011).

As condições ideais para o fungo *P. pachyrhizi* são temperaturas entre 15 e 25 °C, com molhamento foliar de 6 a 12 horas seguidas (Marchetti et al. 1976). Os esporos germinam em um único tubo germinativo com apressório, sendo a penetração do tipo direta no lúmen das células epidérmicas (Furtado et al. 2011), com formação dos primeiros haustórios após 24-48 horas de contato com o hospedeiro (Goellner et al. 2010). Com menor frequência, o processo de penetração se inicia no espaço entre as células adjacentes e, em seguida, o fungo entra em uma destas células (Bonde et al. 1976).

O ciclo da ferrugem-asiática se inicia com uma fonte de inóculo primária, que pode ter origem em plantas voluntárias ou hospedeiros secundários, através dos quais tem início a disseminação dos urediniosporos e, conseqüentemente, a deposição e colonização (Yorinori et al. 2004; Reis et al. 2006; Rupe & Sconyers 2008). Após cinco dias da colonização, começam a ocorrer algumas necroses nas células da epiderme e do mesófilo, que se tornam visíveis na folha através da formação da urédia. A penetração e colonização do patógeno ocorre através

do urediniósporo, que emite um tubo germinativo e um apressório, e este último, origina a hifa de penetração e a hifa de infecção. A partir da hifa de infecção surge o haustório, que penetra na célula e obtém os nutrientes para o patógeno, causando alterações fisiológicas e morfológicas na planta. Como consequência de tais alterações, ocorre o rompimento da epiderme da folha e exposição da massa de urediniósporos através da urédia (Tremblay 2011) (Figura 1). O fator que desencadeia a doença é o clima, que quando favorável, permite o estabelecimento e o desenvolvimento do patógeno ocasionando severos danos (Reis et al. 2006). Cabe ressaltar que a ferrugem-asiática da soja está presente durante todo o ano na Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Reis et al. 2006).

Figura 1: Folha de soja apresentando sintomas causados pela infecção, colonização e reprodução de *P. pachyrhizi* demonstrando a formação de urédias na parte abaxial 20 dias após a inoculação.

A dispersão dos urediniósporos ocorre principalmente pela ação do vento, ocorrendo geralmente em dias secos e com baixa umidade na folha (Yorinori et al. 2010). A disseminação de urediniósporos a curtas distâncias é regulada pela distância da fonte de inóculo, umidade, temperatura, direção e velocidade do vento (Wen et al. 2017). O fenômeno da dispersão ocorre, pois com a ausência de umidade na folha, os esporos aderidos a superfície são carregados com maior facilidade (Reis et al. 2006). Após a deposição dos esporos em uma nova superfície, há a necessidade de que se tenha umidade disponível e temperaturas favoráveis para que a germinação ocorra (Reis et al. 2006; Tsukahara et al. 2008; Yorinori et al. 2010). A capacidade de *P. pachyrhizi* em causar doença é dependente da umidade disponível. A interrupção no período de molhamento foliar afeta diretamente este patógeno, causando a redução da germinação e formação de apressórios e, consequentemente, há um decréscimo na severidade da doença (Furtado et al. 2011). A descontinuação de períodos de molhamento afeta principalmente esporos que já iniciaram o processo de germinação com a umidade disponível inicialmente (Furtado et al. 2011).

Ademais, a ferrugem-asiática da soja é considerada uma doença policíclica, ou seja, podem ocorrer múltiplos ciclos de infecção dentro de um mesmo ciclo da cultura (Godoy et al. 2007). Portanto, as plantas que foram infectadas inicialmente podem atuar como fonte de inóculo para a ocorrência de outras infecções dentro do mesmo ciclo da cultura (Bergamin Filho et al. 2018b).

Os sintomas iniciais da doença são minúsculos pontos mais escuros (esverdeados a cinza-esverdeados) no tecido da folha, correspondendo a urédia na face abaxial (Figura 1) (Godoy et al. 2016b). As lesões são delimitadas pelos vasos e apresentam formato angular, atingindo de 2 a 5 mm de diâmetro (Rupe & Sconyers 2008; Godoy et al. 2016b). Inicialmente, observa-se no local da mancha uma pequena protuberância semelhante a uma ferida de escaldadura, sendo este sintoma o começo da formação de uma urédia que posteriormente começará a liberar urediniósporos (Yorinori et al. 2003). Conforme a esporulação aumenta, as lesões ficam facilmente visíveis em ambas as faces da folha. Com o acúmulo de urediniósporos sobre as uredínias, as estruturas do fungo ficam mais visíveis (Yorinori et al. 2003).

Há uma tendência de que o ciclo das ferrugens seja mais complexo e envolva diferentes tipos de esporos com especialização de hospedeiros. Em relação à *P. pachyrhizi*, não existem muitas informações sobre o ciclo sexual. Para ferrugens dicarióticas, há a formação de teliósporos, cariogamia e divisão, finalizando com a formação de quatro basidiósporos haploides. Apesar de que já existem relatos de observação de teliósporos de *P. pachyrhizi* na Ásia, a germinação dos mesmos nunca foi constatada em condições naturais (Bromfield 1984), sendo apenas induzida em condições laboratoriais (Saksirirat & Hoppe 1990).

O fungo causador da ferrugem-asiática da soja produz urediniósporos em seu ciclo assexual (Figura 2), os quais são liberados das urédias através de uma abertura denominada ostíolo (Goellner et al. 2010). Os urediniósporos germinam em um único tubo germinativo que apresenta certa sensibilidade a luz, uma vez que experimentos demonstraram desenvolvimento do tubo germinativo em condições de escuro e não na luz (Koch & Hoppe 1987; Goellner et al. 2010). O tubo germinativo é terminado em um apressório, não ornado e que apresenta tamanho aproximado ao do urediniósporo (Goellner et al. 2010). A penetração de *P. pachyrhizi* é de forma direta no tecido foliar e a formação do primeiro urediniósporo foi observada após 24-48 horas do contato inicial entre o patógeno e o hospedeiro suscetível (Goellner et al. 2010). Após, ocorre a colonização de forma intensa do tecido do mesófilo e o preenchimento com micélio fúngico dos espaços intercelulares (Goellner et al. 2010).

Considera-se que a reprodução assexual está completa quando há o desenvolvimento de uma nova urédia a partir de urediniósporos originados de uma urédia anterior (Koch et al. 1983).

Figura 2: Ciclo de vida de *P. pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja ocasionada por *P. pachyrhizi*. Ciclo construído baseado em: ¹Bonde et al. 1976; ⁴Yeh 1981; ³Reis et al. 2006; ²Zambenedetti et al. 2007; ⁵Garcés et al. 2010. Crédito do infográfico: Marcelo Madalosso – Instituto Phytus

Os danos ocasionados pela ferrugem-asiática variam em função do estágio fenológico da planta, sendo que a doença pode ocorrer em todas as fases do crescimento da planta (Hsu & Wu 1968; Yang 1990; Moreira 2009; Godoy et al. 2016b). Entretanto, ocorre com maior frequência com o fechamento do dossel das plantas pela maior umidade e sombreamento. Quando ocorre a infecção e há uma alta densidade de lesões, ocorre o amarelecimento folhar e desfolha precoce (Bergamin Filho et al. 2018a), o que compromete a formação e enchimento de grãos, o peso final e a qualidade da semente (Godoy et al. 2016b). As lesões ocasionadas por *P. pachyrhizi* podem ser de dois tipos: TAN (castanha) e RB (*reddish-brown*; marrom-avermelhada).

As lesões do tipo TAN (suscetível) esporulam abundantemente e não apresentam necrose extensiva, enquanto que as lesões do tipo RB apresentam necrose extensiva com baixa esporulação, indicando uma reação de resistência (Rupe & Sconyers 2008; Godoy et al. 2016b). O tipo das lesões depende da interação entre o isolado de *P. pachyrhizi* e o genótipo da planta (Koga et al. 2008; Godoy et al. 2016b).

O controle da ferrugem-asiática deve envolver as diversas técnicas do manejo integrado. Há muito tempo o controle da ferrugem-asiática tem se baseado no uso de fungicidas (Godoy & Canteri 2004), sendo que atualmente esta continua sendo uma das ferramentas mais difundidas de controle através da utilização de produtos pertencentes aos grupos dos inibidores de desmetilação, inibidoras de quinona externa e inibidores de succinato desidrogenase, principalmente (Godoy et al. 2016a). Com a utilização de tais produtos, as perdas decorrentes da ferrugem-asiática foram reduzidas, entretanto, a utilização de fungicidas foi intensificada e estes representaram um custo de aproximadamente 2,2 bilhões de dólares na safra 2013/2014, considerando uma média de três aplicações (Godoy et al. 2016a).

A utilização de cultivares precoces, semeadura na época recomendada e o monitoramento de temperatura e umidade favoráveis ao patógeno contribuem para o sucesso do manejo desta doença (Godoy et al. 2016b). Há alguns anos já existem algumas cultivares resistentes para algumas regiões brasileiras (Azevedo et al. 2007; Henning et al. 2010), porém, devido a ampla variabilidade que a *P. pachyrhizi* apresenta, o desenvolvimento de cultivares resistentes se torna mais difícil (Soares et al. 2004). Mesmo para cultivares que apresentam resistência, vem sendo recomendado ao menos uma aplicação de fungicidas na tentativa de evitar a quebra desta resistência (Henning et al. 2010). Entretanto, já existem diversos relatos do surgimento de raças de *P. pachyrhizi* que suplantam a resistência de variedades de soja supostamente resistentes ao patógeno (Paes 2015).

Na tentativa de eliminar plantas que possam servir de inóculo para safras subsequentes, a maioria das regiões do país também adotam o controle cultural, através do vazio sanitário como uma medida de manejo para a doença capaz de atrasar as primeiras infecções por *P. pachyrhizi* (Godoy et al. 2016a) e também possibilitar o atraso da aplicação de produtos utilizados na proteção das plantas (Bergamin Filho et al. 2018a). Esta forma de controle consiste na proibição do cultivo por lei em um determinado período de entressafra, excluindo-se desta, os cultivos com finalidade de pesquisa científica e experimentos, desde que se obtenha a autorização prévia do órgão estadual de defesa sanitária (Mapa, 2014).

Com os crescentes problemas envolvendo a ocorrência de doenças, torna-se imprescindível buscar alternativas que possam contribuir para a mitigação dos problemas fitopatológicos sobre a produção agrícola. Outras alternativas para o controle da ferrugem-asiática da soja vêm sendo testadas nos últimos anos, como a utilização de óleos essenciais (Medice et al. 2007; Borges et al. 2013). Todavia, existe outro método que vem sendo testado

e demonstrando bons resultados (Duarte et al. 2009; Oliveira et al. 2015), o qual está recebendo maior enfoque, a indução de resistência.

Neste sentido, o uso de agentes indutores, como a taxtomina A (Garcia et al. 2007a, c, b, 2008b, a) surgem como alternativas que podem contribuir com o manejo de enfermidades de plantas, podendo ao mesmo tempo contribuir para a redução no uso de produtos químicos que quando utilizados inadequadamente podem afetar a saúde humana e o equilíbrio dos ecossistemas (Romeiro 2008). Deve-se considerar ainda que os indutores de resistência podem ser utilizados em conjunto com o controle químico, buscando auxiliar na melhora de eficiência destes produtos, bem como no uso racional dos mesmos.

2.3. Indução de resistência

Na busca por métodos alternativos de controle das doenças, surge a indução de resistência como uma saída promissora. Uma planta que apresenta resistência possui a capacidade de resistir ao ataque de fitopatógenos e pragas, pois consegue expressar as suas respostas de defesa a infecção mais rapidamente (Hammerschmidt 2007). Cabe ressaltar que cada interação patógeno-hospedeiro pode ser vista como uma luta entre dois organismos para a sobrevivência, onde o patógeno buscando sobreviver ataca o hospedeiro com suas armas químicas e o hospedeiro se defende através de mecanismos de defesa estruturais e/ou bioquímicos (Pascholati & Dalio 2018a). A resistência é considerada como a capacidade que determinada planta possui em atrasar e/ou evitar a colonização e atividade do patógeno no tecido, sendo considerado que na natureza a resistência é a regra e a suscetibilidade a exceção (Agrios 2005; Pascholati & Dalio 2018a).

A defesa das plantas a fitopatógenos pode ser de maneira ativa ou passiva, sendo os mecanismos de defesa classificados em pré e pós-formados. Os mecanismos de defesa pré-formados são os existentes antes da chegada do patógeno, enquanto que os mecanismos pós-formados estão ausentes ou em níveis baixos antes da infecção, sendo posteriormente ativados como uma resposta a chegada do patógeno (Pascholati & Dalio 2018a).

Os mecanismos de defesa pré-formados bioquímicos envolvem compostos fenólicos, alcaloides, fototoxinas, entre outros (Pascholati & Dalio 2018a). Enquanto que os mecanismos bioquímicos pós-formados compreendem, por exemplo, espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (Pascholati & Dalio 2018a).

Os compostos fenólicos produzidos pelas plantas têm como característica a solubilidade em água devido a sua frequente forma de glicosídeos, além de se localizarem,

geralmente, nos vacúolos celulares (Schwan-Estrada et al. 2008). Tais compostos são substâncias que podem apresentar efeito fungitóxico, antivirótico e antibacteriano, sendo que os efeitos como, por exemplo, inibidor da germinação de esporos e crescimento micelial, alteração na atividade e/ou produção de enzimas microbianas podem variar em função de cada grupo (Friend 1981). Logo, tanto alterações nos mecanismos estruturais quanto bioquímicos de resistência podem envolver estes compostos (Nicholson & Hammerschmidt 1992; Nicholson 1995).

As espécies reativas de oxigênio são moléculas transitórias e reativas, as quais tem sua produção atrelada ao caminho metabólico da transformação do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O) (Pascholati & Dalio 2018a). Podem atuar diretamente sobre o patógeno e inibir o seu crescimento, podendo também reforçar a parede celular através do fortalecimento de ligações cruzadas com proteínas estruturais e ainda fortalecer a integridade da membrana plasmática (Pascholati & Dalio 2018a). Ademais, o peróxido de hidrogênio é dito como a espécie mais estável e prontamente transportável pela membrana, o qual pode estar relacionada com a expressão de genes ligados a resistência ou ter atuação na síntese de mensageiros secundários, como ácido jasmônico (Pascholati & Dalio 2018a).

As proteínas-RP podem ter sua produção associada ao desenvolvimento normal da planta, a ocorrência de estímulos abióticos ou ainda como componentes de um sistema de defesa induzível contra fitopatógenos, o qual pode atuar no controle (Pascholati & Dalio 2018a). Estas proteínas são caracterizadas por apresentarem estabilidade em pH baixo (2,8) e altas temperaturas (60-70 °C), além de resistirem a ação de enzimas proteolíticas (Pascholati & Dalio 2018a). Dentre as proteínas-RP cabe destacar a β -1,3 glucanase. Estas endoglucanases são constituídas por monômeros que possuem massa molecular na faixa de 25 a 35 kDa e apresentam a capacidade de produzir unidades de glicose, a partir do substrato laminarina (Cavalcanti et al. 2005a). Esta proteína-RP tem sua importância nos mecanismos de defesa das plantas contra fungos uma vez que a β -1,3 glucana é um componente importante da parede celular destes microrganismos (Cavalcanti et al. 2005a).

Assim como a β -1,3 glucanase, as quitinases também constituem-se de monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa e são importantes na defesa de plantas, uma vez que hidrolisam com eficiência a quitina e são um dos principais componentes da parede celular de muitos fungos (Cavalcanti et al. 2005a). Estudos demonstram que o aumento da resistência de plantas à patógenos está associado a expressão de genes de quitinases e que além da capacidade de hidrolisar com eficiência a quitina, um dos principais componentes da parede

celular de muitos fungos, pode ter potencial antimicrobiano (Cavalcanti et al. 2005a; van Loon et al. 2006).

Ademais, alterações metabólicas ocorrem em função da expressão dos mecanismos de defesa das plantas e tais alterações correlacionam-se com modificações na atividade de enzimas consideradas chave para o metabolismo primário e secundário, como a peroxidase (Cavalcanti et al. 2005a). Esta enzima está presente nos tecidos das plantas e participa de vários processos fisiológicos (Hoagland 1990). As peroxidases são descritas como glicoproteínas com massa molecular aproximada de 40 kDa, sendo as mesmas capazes de metabolizar H_2O_2 (Cavalcanti et al. 2005a). A ativação das peroxidases pode acontecer pela ocorrência de danos na membrana plasmática, pela ação de enzimas proteolíticas ou por ruptura mecânica da parede celular (Reimann et al. 1992). Há uma elevada afinidade de peroxidases com parede e outros componentes celulares, sendo possível que durante o processo de lignificação, a mesma fique aderida na parede celular ou membrana (Cavalcanti et al. 2005a). A lignina, em conjunto com outros polissacarídeos e a celulose que ocorrem na parede celular atuam como uma barreira física à penetração de fungos. Além da barreira mecânica, tais substâncias podem alterar a resistência a enzimas hidrolíticas, através de modificações na parede celular (Vance et al. 1980).

Também conhecida como indução de proteção ou imunidade adquirida, a resistência induzida consiste na ativação de mecanismos latentes de resistência através de agentes externos em uma planta, podendo estes agentes serem de origem biótica ou abiótica, sem alterar o genoma (Cavalcanti et al. 2005b). A proteção induzida depende do intervalo de tempo entre o tratamento indutor e o tratamento provocador (inoculação do patógeno). O agente indutor pode ser qualquer composto ou fator que apresente capacidade de ativar mecanismos de defesa da planta e o eliciador a molécula presente no indutor que responde diretamente pela ativação dos mecanismos de defesa (Bonaldi et al. 2005).

A duração do efeito protetor dos indutores de resistência varia em função do indutor e da planta, podendo durar poucos dias até semanas ou por todo o ciclo de cultivo da planta (Pascholati & Dalio 2018a). Outro ponto que deve ser destacada é a inespecificidade, o que possibilita que haja a ação sobre um amplo espectro de fitopatógenos.

Além disso, recentemente descobriu-se a existência de um fenômeno denominado de “*priming*”, ou seja, verificou-se a existência de um pré-condicionamento/sensibilização de plantas contra uma infecção de fitopatógenos que ocorre subsequentemente (Herms 2002), possibilitando a expressão da defesa de forma mais rápida e efetiva (Goellner & Conrath 2008; Mauch-Mani et al. 2017). Adicionalmente, pesquisadores também verificaram a

ocorrência de um estado de “*priming*” transgeracional, ou seja, as características de resistência de plantas parentais pré-condicionadas são transmitidas para a próxima geração através das sementes (Balmer et al. 2015). Tal fato pode ser dito como a existência de um tipo de memória da planta, a qual consegue reagir de forma mais rápida e adequada quando submetidas ao ataque de um fitopatógeno (Balmer et al. 2015).

O fenômeno da indução de resistência foi alavancado pelos avanços da biologia molecular e engenharia genética, o que vem facilitando o esclarecimento de muitas bases relacionadas a resistência e suscetibilidade de plantas a fitopatógenos (Pascholati & Dalio 2018a).

O monitoramento do fenômeno da indução de resistência pode ser realizado através da verificação de alterações bioquímicas em plantas, como a atividade de guaiacol peroxidase (Lusso & Pascholati 1999), β -1,3 glucanase (Kombrink & Hahlbrock 1986), quitinase (Busso & Mazaro 2015), compostos fenólicos (Rodrigues et al. 2005), entre outros. Além disso, com os avanços da biologia molecular também é possível realizar o monitoramento de genes sabidamente envolvidos com a ativação de vias de defesa, o que possibilita um detalhamento maior do fenômeno (Schweizer et al. 1997; Clarke et al. 2000; Glazebrook 2001; Kiba et al. 2003; Shores et al. 2005; van Verk et al. 2011; Liu et al. 2016).

Dentre os genes que podem ser monitorados, estão o MeSA, NPR1 e PR1 relacionados a via do ácido salicílico (Figura 3). Também pode-se monitorar a expressão do gene MYC2 relacionado a via do jasmonato e os genes ACC e ERF1 relacionados a via do etileno (Dalio et al. 2018). O monitoramento de tais genes se torna importante a medida que durante a infecção por um patógeno, diferentes fitormônios podem ser induzidos e agir como moléculas sinalizadoras para desencadear a produção de compostos antimicrobianos (Verma et al. 2016). De maneira geral, as plantas produzem ácido salicílico, jasmonato e etileno como principais sinais de defesa ao ataque de patógenos (Robert-Seilanian et al. 2011).

Figura 3: Genes relacionados a ácido salicílico, jasmonato, etileno, genes R, explosão oxidativa, fisiologia e reprodução. Adaptado de Dalio et al. (2018).

2.4. A fitotoxina taxtomina

No que diz respeito a indução resistência, atualmente as fitotoxinas representam uma possibilidade no controle de doenças de plantas na qualidade de eliciador em potencial. Essas moléculas são descritas como compostos secundários com baixa massa molecular, produzidos por fitopatógenos que podem afetar o metabolismo e/ou estrutura da célula hospedeira, podendo levar a morte do hospedeiro (Berestetskiy 2008). As fitotoxinas muitas vezes estão relacionadas a agressividade do patógeno ou envolvidas com fatores de patogenicidade (Pascholati et al. 2008; Möbius & Hertweck 2009).

A capacidade de espécies de *Streptomyces* produzirem fitotoxinas como mecanismo de patogenicidade já era considerada desde o século passado. Todavia, somente mais tarde houve a confirmação, através do isolamento e caracterização das fitotoxinas com capacidade de causarem necrose em tecidos de tubérculos de batata (Fellows 1926; King et al. 1989). A fitotoxina taxtomina A (CAS: 122380-18-1) foi caracterizada e definida estruturalmente (Figura 4), como uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina, um dipeptídeo derivado da fenilalanina e um aminoácido triptofano com radical nitrato (King et al. 1989), tendo como fórmula molecular $C_{22}H_{22}N_4O_6$.

Figura 4: Estrutura da molécula da fitotoxina taxtomina A ($C_{22}H_{22}N_4O_6$), produzida por *Streptomyces scabies*. Crédito da imagem: PubChem

Esta fitotoxina foi denominada de “Taxtomina A” em homenagem a Roland Thaxter, pesquisador que estabeleceu primeiro a relação entre a sarna da batata e *S. scabies* (King & Lawrence 1996). Os integrantes do gênero *Streptomyces* são actinobactérias gram-positivas, com altas quantidades de guanina e citosina no DNA, sendo que as espécies mais estudadas são *S. scabies*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* (Loria et al. 2006). Todas as espécies de *Streptomyces* produzem taxtomina A ou outras fitotoxinas, sendo que a taxtomina A possui a capacidade de interferir no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas por apresentar amplo espectro (Leiner 1996).

Diversas pesquisas foram conduzidas visando esclarecer o modo de ação da taxtomina A, como por exemplo, em plantas de sorgo analisando-se a importância dessa toxina e das concanamicinas, bem como na agressividade de *S. scabies* em batata (Garcia et al. 2007a, c, b; Garcia & Pascholati 2008; Garcia 2008). Outros estudos mostraram que algumas fitotoxinas podem ativar mecanismos de defesa e induzir resistência em plantas, como o ácido oxálico produzido por *Sclerotinia sclerotiorum* e a coronatina produzida por *Pseudomonas syringae* (Doubrava et al. 1988; Toal & Jones 1999; Fliegmann et al. 2003).

No mesmo sentido, pesquisas realizadas com taxtomina A demonstraram que esta foi capaz de induzir resistência em pepineiro (Garcia et al. 2008a) contra *Colletotrichum lagenarium*, em sorgo (Garcia et al. 2008b) contra *C. sublineolum* (local e sistêmica) e em fumo contra TMV. Ademais, plantas de sorgo que receberam o tratamento com taxtomina A apresentaram atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase superior a plantas não tratadas (Garcia et al. 2008b), além de terem acumulado mais fitoalexinas (Garcia 2008). Estes resultados proporcionaram o depósito de uma patente por Sérgio Florentino Pascholati e Ely Garcia (P. I. 0.802.664-5 – 13/08/2008).

Além disso, em *Arabidopsis thaliana*, a taxtomina ocasionou resposta mais precoce relacionada ao influxo de Ca^{2+} , o qual atua como mensageiro chave na reação quando da infecção da planta por patógenos (Tegg et al. 2005; Errakhi et al. 2008). A resposta da planta mediada por cálcio em *A. thaliana* foi a morte celular programada (Duval et al. 2005). A ocorrência de sinalização de cálcio em células vegetais, como resposta a moléculas originadas de patógenos pode desencadear uma elevação no nível de Ca^{2+} citosólico, que por sua vez é fundamental para respostas oxidativas e indução de defesa em plantas (Gerber et al. 2004; Kurusu et al. 2005). Desta forma, fica evidente o potencial que a taxtomina A possui como agente de indução de resistência em plantas a fitopatógenos.

No que diz respeito ao efeito direto de taxtomina A sobre fitopatógenos, em estudo realizado com *Phytophthora plurivora* e *P. nicotianae*, observou-se que esta fitotoxina não exibia efeito direto sobre o crescimento micelial e zoósporos de tais patógenos (Brand 2016). Entretanto, quando um estudo foi realizado com a mesma fitotoxina e o patógeno *Colletotrichum sublineolum*, houve redução do crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressório, o que demonstrou que a taxtomina A também pode ter efeito direto, além de ativador de defesa de plantas (Garcia et al. 2008b). A existência de efeito direto também foi detectada através da redução do crescimento micelial *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Pinto 2014). Todavia, como já comentado, a ocorrência do efeito direto de taxtomina A pode variar em função de cada fitopatógeno, planta e também da concentração da fitotoxina utilizada (Brand 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos a seguir foram realizados junto ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP), Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) e campo experimental da PROMIP (Conchal – SP), com auxílio da Stoller do Brasil LTDA.

3.1. Obtenção de plantas de soja

As sementes de soja foram semeadas em vasos de 2,5 L de capacidade, contendo substrato (Basaplant - Turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de pinus) sendo, posteriormente, acomodados sob condições de temperatura e umidade parcialmente controladas. Foram semeadas quatro sementes por vaso e as plantas foram irrigadas regularmente. A cultivar utilizada foi a 74HO112TPIPRO (HO Paranaíba IPRO), desenvolvida pela HO Genética. Esta cultivar apresenta um grupo de maturação médio, com ponto médio de colheita aos 108 dias. Possui hábito de crescimento indeterminado e boa resistência ao acamamento, sendo suscetível a *P. pachyrhizi*.

3.2. Obtenção e manutenção do inóculo de *P. pachyrhizi*

O inóculo de *P. pachyrhizi* foi obtido junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Soja (EMBRAPA – CNPSO), localizada na cidade de Londrina/PR.

A manutenção do inóculo foi realizada em plantas obtidas conforme *item 3.1* e alocadas no interior de caixas de filme plástico construídas para esta finalidade (Figura 5). As caixas foram mantidas no interior de uma casa de vegetação e a umidade foi mantida através de um umidificador acoplado na lateral da caixa, o qual tinha seu funcionamento programado para 15 min hora⁻¹, com auxílio de um “timer” analógico.

Figura 5: Caixa construída para a manutenção de plantas de soja utilizadas como fonte de inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* com umidade mantida por umidificador instalado lateralmente.

Quando as plantas que permaneceram como fonte de inóculo apresentaram severidade elevada e consequente desfolha elevada, ocorreu a substituição das plantas por novas plantas para que o processo se repetisse. Desta forma, o inóculo foi mantido durante toda a estação de trabalho, tendo a produção de urediniósporos de maneira contínua para a coleta e utilização em experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Além da manutenção da umidade no interior da caixa com o umidificador, fez-se o fornecimento de água diretamente no vaso para a manutenção da umidade no substrato requerida pela planta para o seu desenvolvimento. Não foi realizado o aporte com adubação junto ao substrato devido ao curto período demandado para a substituição de plantas, como consequência da desfolha.

3.3. Produção e preparo dos agentes utilizados nos tratamentos

3.3.1. Controle negativo

Como controle negativo, utilizou-se água autoclavada.

3.3.2. Meio aveia sem *Streptomyces scabies*

O tratamento meio-aveia, o mesmo foi composto por 40 g de farinha de aveia comercial diluídos em 1000 mL de água destilada. Inicialmente, submeteu-se o meio a um liquidificador por 2 minutos para homogeneização e distribuiu-se o volume de 100 mL em frascos do tipo Erlenmeyer, sendo em seguida realizada a autoclavagem (20 min. – 121 °C – 1 atm). Após, os frascos foram incubados a 28 °C sem inoculação da bactéria pelo período de 5 dias em agitação contínua (225 rpm) e escuro. Em seguida, adicionou-se 200 mL de água destilada autoclavada ao volume inicial de cada frasco, fazendo-se uma nova homogeneização em liquidificador por 2 minutos e retirando-se uma alíquota de 50 mL de volume total, diluindo esta em 2450 mL de água destilada autoclavada. O volume final de 2500 mL compôs o tratamento meio-aveia.

3.3.3. Meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e não autoclavado

Para o tratamento suspensão de células foi cultivada *S. scabies* em meio-aveia (40 g L⁻¹) pelo período de 5 dias. Para tanto, adicionou-se 100 mL de meio de cultivo aveia em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade para 250 mL e procedeu-se com a autoclavagem por 20 min, 121 °C e 1 atm. Após, os frascos foram retirados da autoclave e aguardou-se até

que atingissem a temperatura ambiente, onde neste momento, em fluxo laminar, fez-se a adição de 250 µL de uma suspensão de *S. scabies* previamente cultivada em meio líquido, conforme item 3.3.3. Em seguida, os frascos foram incubados a 28 °C e mantidos sob a agitação (225 rpm) em escuro. Após 5 dias, os frascos foram retirados da incubadora e adicionado 200 mL de água autoclavada ao conteúdo inicial do frasco, totalizando um volume final de 300 mL, sendo homogeneizado em liquidificador por 2 minutos. Após, retirou-se uma alíquota de 50 mL do volume total e fez-se a autoclavagem. Em seguida, esta alíquota foi diluída em 2450 mL de água destilada autoclavada, totalizando um volume final de 2500 mL, os quais foram utilizados como a suspensão de células autoclavada. Uma alíquota de 50 mL coletada após a homogeneização também foi diluída seguindo a mesma proporção supracitada, entretanto esta não sofreu o processo de autoclavagem e compôs o tratamento suspensão de células não autoclavada.

3.3.4. Filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies*

Para o tratamento filtrado, a *S. scabies* foi cultivada da mesma forma que para o tratamento meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e não autoclavado. Após 5 dias, o conteúdo do frasco foi inicialmente filtrado em gaze para a retirada de partículas mais grosseiras inerentes ao meio de cultivo e, em seguida, o volume filtrado foi centrifugado a 9000 g por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante resultante da centrifugação foi filtrado em membrana do tipo Millipore™ (0,22 µm) e diluído nove vezes em água autoclavada, compondo o tratamento filtrado.

3.3.5. Taxtomina parcialmente purificada

Para a produção e extração foram seguidos os procedimentos propostos na metodologia adotada por Garcia (2008), com alterações. O isolado de *S. scabies* foi cultivado em meio de farinha de aveia líquido, em Erlenmeyers de 250 mL. O meio foi composto por 40 g de farinha de aveia em 1000 mL de água, sendo distribuídos 100 mL por frasco. Cada erlenmeyer recebeu 250 µL de uma suspensão de *S. scabies* previamente cultivada em meio líquido por 5 dias. Em seguida, os erlenmeyers foram incubados por 5 dias a 28 °C e 225 rpm em escuro. Após essa etapa, o conteúdo de cada frasco foi peneirado (peneira comum) para realizar a separação das partículas mais grosseiras inerentes ao meio de cultivo. O filtrado foi transferido para um funil de separação e seguido da adição do solvente acetato de etila, na proporção de 3:5 (volume/volume). A fração do acetato de etila foi coletada e desidratada com sulfato de sódio anidro e o solvente posteriormente evaporado. O pó que resultou deste

procedimento foi ressuspenso em metanol e armazenado a -20 °C no interior de microtubos representando a TPP. Quando da utilização, o metanol foi evaporado em capela e o conteúdo de cada microtubo ressuspenso em água autoclavada. Após a ressuspensão em água, a TPP foi quantificada em espectrofotômetro a 400 nm, tomando-se como referência que o valor de absorbância de 0,525 corresponde a 143 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina (Pascholati 2010¹). A concentração foi ajustada de acordo com cada experimento.

3.3.6. Acibenzolar-S-metílico

Para o tratamento Acibenzolar-S-metílico (Bion[®] 50 WG – Syngenta), utilizou-se a concentração de 25 g ha⁻¹ recomendada para a cultura do feijão, considerando um volume de calda de 150 L ha⁻¹. Portanto, a concentração de trabalho foi de 0,166 g L⁻¹.

3.3.7. Fungicida

O fungicida utilizado foi o picoxistrobina + benzovindiflupir (100 g L⁻¹ i.a. + 50 g L⁻¹ i.a.) (Vessarya[®], DuPont), na concentração de 500 mL ha⁻¹ e considerando um volume de calda de 150 L ha⁻¹, utilizando-se, assim, uma concentração de trabalho de 3,33 mL L⁻¹.

3.4. Experimentos realizados

3.4.1. Avaliação do efeito direto *in vitro* dos agentes sobre urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Visando verificar o efeito sobre a germinação de urediniósporos, fez-se um teste de germinação com os tratamentos citados na Tabela 1 para verificar seu possível efeito direto.

Tabela 1: Lista de tratamentos e doses utilizados para os experimentos

Tratamento	Dose
Controle negativo	-
Meio-aveia sem <i>Streptomyces scabies</i>	40 g L ⁻¹ (diluído 52 vezes)
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado	Diluído 52 vezes
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> não autoclavado	Diluído 52 vezes
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	Diluído 9 vezes
Taxtomina parcialmente purificada	100 µg equiv. mL ⁻¹
Acibenzolar-S-metílico	0,166 g L ⁻¹ p.c.*
Fungicida	3,3 mL L ⁻¹ p. c.*

*p.c.: produto comercial

¹ Comunicação pessoal do Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ/USP).

Para tanto, utilizou-se o método da gota para o teste de germinação, onde uma alíquota conhecida de urediniósporos (1×10^5) e outra do agente foi colocada em uma mesma gota sobre uma placa de Petri de poliestireno e incubada para se verificar o efeito direto de cada tratamento. Portanto, utilizou-se placas de poliestireno de 90 mm de diâmetro, onde em cada placa foram adicionadas 3 gotas. Cada gota foi composta por 50 μL da suspensão de urediniósporos e 50 μL de cada um dos tratamentos, totalizando um volume final de 100 μL cada gota. Após a adição das duas alíquotas, as placas foram incubadas a 25 °C pelo período de 8 horas na ausência de luz. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos (Tabela 1) e 5 repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma placa de Petri com 3 gotas. Após 8 horas, fez-se a contagem dos urediniósporos germinados com auxílio de um microscópio óptico, contando-se 100 urediniósporos ao acaso. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentaram tubo germinativo igual ou maior ao diâmetro do urediniósporo. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação e também foi calculada a porcentagem de inibição em relação ao controle.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.2. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada na germinação de urediniósporos de *P. pachyrrhizi*

Sabendo-se da possível existência de efeito direto da taxtomina sobre a germinação de urediniósporos, buscou-se saber qual a possível concentração capaz de inibir totalmente a germinação de urediniósporos de *P. pachyrrhizi*. Para tanto, além do controle, foram testadas sete concentrações distintas de taxtomina parcialmente purificada, sendo: 25 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, 75 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$. Visando testar tais concentrações, utilizou-se um teste de germinação da gota, onde em placas de Petri de poliestireno de 90 mm de diâmetro foi adicionada uma gota ao centro composta por 50 μL de uma suspensão de urediniósporos (1×10^5) e 50 μL de cada uma das concentrações. As placas foram incubadas em B.O.D. a 25 °C pelo período de 8 horas na ausência de luz. Após, as placas foram retiradas e fez-se a contagem de 100 urediniósporos ao acaso, calculando-se a porcentagem de germinação. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 5 repetições, sendo os tratamentos as diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada e cada repetição constituída por uma placa de Petri.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4.3. Efeito da taxtomina parcialmente purificada sobre urediniósporos de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas

Visando a elucidação do possível efeito fungicida da taxtomina sobre urediniósporos, realizou-se este experimento utilizando a metodologia da folha destacada. Inicialmente, urediniósporos foram coletados e submetidos aos tratamentos, que foram taxtomina parcialmente purificada 200 μg equiv. mL^{-1} e controle. Para tanto, os urediniósporos foram adicionados em microtubos do tipo *Eppendorf*, contendo 1 mL de cada tratamento e mantidos por 50 min ou 90 min em contato direto. A cada 10 minutos, os microtubos foram agitados em agitador de bancada do tipo Vortex. Após este período, os microtubos contendo os tratamentos e os urediniósporos foram centrifugados a 13000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL de água destilada em cada microtubo, sendo mantido sob agitação por 5 minutos em agitador de microtubos de bancada (Vortex) e submetido a uma nova centrifugação. Este processo de lavagem dos urediniósporos foi repetido por 3 vezes. Após o último ciclo de lavagem, o *pellet* de urediniósporos foi ressuspenso em água destilada autoclavada e feita a calibração da suspensão para 1×10^5 urediniósporos mL^{-1} .

Em seguida, folhas de soja sadias foram coletadas e acomodadas conforme a metodologia da folha destacada (Figura 6) e a suspensão de urediniósporos inoculada por aspersão até o ponto de escorrimento. As placas de petri contendo as folhas inoculadas foram incubadas em câmara de crescimento, tipo B.O.D., pelo período de 12 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz. Aos 12 dias, a severidade foi avaliada através da contagem do número de pústulas cm^2 . O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma placa contendo uma folha de soja em estágio V3. O experimento foi repetido por duas vezes para cada tempo e os dados médios apresentados, sendo submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste t-Student.

Figura 6: Placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro saturadas com água e duas lâminas simples de microscopia, sobre as quais o folíolo de soja foi acomodado e ao seu pecíolo adicionado um pequeno chumaço de algodão.

3.4.4. Efeito de diferentes preparações de potenciais indutores de resistência aplicados em folhas destacadas, no controle de *P. pachyrhizi*

Sabendo-se que a taxtamina já tem seu potencial como ativadora de resistência em plantas relatado na literatura, neste experimento buscou-se testar o seu efeito como indutora de resistência no patossistema soja-*P. pachyrhizi*. Para tanto, plantas de soja foram cultivadas conforme mencionado *item 3.1* até o estágio V3, quando as folhas foram coletadas para a execução deste experimento. Após a coleta, as folhas foram levadas até o laboratório e acomodadas em placas de Petri, conforme a metodologia da folha destacada (Figura 6). Os tratamentos utilizados neste experimento e seu respectivo preparo foram descritos no *item 3.3*, sendo utilizado neste experimento a TPP na concentração de 100 µg equiv. mL⁻¹.

Os tratamentos foram aplicados nas folhas destacadas através de aspersão até o ponto de escoamento (± 600 µL). Em seguida, as folhas foram incubadas em câmara de crescimento, tipo B.O.D., a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz por 72 horas. Após este período, as placas de Petri, contendo as folhas destacadas, foram retiradas da B.O.D. e fez-se a inoculação através da aspersão de uma suspensão de urediniósporos (1×10^5) de *P. pachyrhizi*. Na sequência, as folhas foram novamente incubadas nas mesmas condições pelo período de 12 dias. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamento e 5 repetições.

Ao final deste período, as folhas foram retiradas da incubadora e procedeu-se a quantificação da severidade através da contagem do número de pústulas cm⁻², bem como da produção e germinação dos urediniósporos produzidos.

Para a quantificação da produção de urediniósporos, a contagem foi realizada através de uma alíquota obtida da lavagem de cada folha em 5 mL de água destilada e posterior contagem em hemocitômetro. Os resultados foram expressos em número de urediniósporos mL⁻¹. Já para o teste de germinação, adotou-se o teste na gota, na qual uma alíquota de 100 µL da suspensão de urediniósporos (1×10^5) obtida para a quantificação foi colocada no centro de uma placa de Petri de poliestireno e incubada a 25 °C por 8 horas em escuro. Após este período, fez-se a contagem de urediniósporos germinados em microscópio óptico, considerando-se germinados os que apresentaram tubo germinativo igual ou maior ao seu diâmetro. Os resultados foram expressos em porcentagem. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos em 5 repetições. O experimento foi realizado por duas vezes e os dados médios apresentados. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.5. Efeito dos diferentes tratamentos na severidade e respostas bioquímicas de plantas de soja à *P. pachyrhizi*, em condições de casa de vegetação

Em vasos de 2,5 L contendo substrato Basaplant foram semeadas 4 sementes de soja da cultivar HO Paranaíba IPRO e mantidas em condições de casa de vegetação. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V3 (dois trifólios expandidos), foram pulverizados os tratamentos (Tabela 2) selecionados pelos resultados obtidos no teste *in vitro* realizado conforme o item 3.4.4. Os agentes foram aplicados combinados ou não com a inoculação. A pulverização foi realizada e 72 horas após procedeu-se com a inoculação. A inoculação consistiu na aspersão de uma suspensão de urediniósporos (1×10^5 urediniósporos mL⁻¹).

Tabela 2: Tratamentos e concentrações utilizados para a verificação da redução da severidade e respostas bioquímicas

Tratamentos	Dose
Controle negativo	-
Controle negativo + <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	-
Acibenzolar-S-metílico	0,166 g L ⁻¹ p.c.
Acibenzolar-S-metílico + <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	0,166 g L ⁻¹ p.c.
Taxtamina parcialmente purificada	100 µg equiv. mL ⁻¹
Taxtamina parcialmente purificada + <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	100 µg equiv. mL ⁻¹
Fungicida	3,33 mL L ⁻¹ p.c.
Fungicida + <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	3,33 mL L ⁻¹ p.c.

*p.c.: produto comercial

A severidade foi avaliada 12 dias após a inoculação, com auxílio de escala diagramática (Franceschi et al. 2017). Para esta avaliação, considerou-se apenas a severidade dos dois primeiros trifólios de cada planta. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma planta. O experimento foi realizado por duas vezes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

As coletas para as análises bioquímicas foram realizadas em três momentos: no momento da aplicação dos tratamentos (0 h), 72 horas após a aplicação dos tratamentos (72 h) e 48 horas após a inoculação (120 h). Em cada um destes momentos, fez-se a coleta de 0,5 g de tecido vegetal. Para a quantificação de proteínas totais e peroxidase coletou-se o tecido referente ao primeiro trifólio de cada planta do experimento I. Já para a análise de fenóis livres e ligados, fez-se a coleta do tecido vegetal referente ao segundo trifólio de cada planta do experimento II. As amostras foram coletadas, pesadas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da maceração para obtenção dos extratos para a realização das análises bioquímicas.

3.4.5.1. Análises bioquímicas

3.4.5.1.1. Preparo do extrato enzimático

As amostras de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando-se almofariz e pistilo. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,0), na proporção 1:5 (peso/volume) acrescido de polivinilpirrolidona (PVPP) 0,5% (peso/volume). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g durante 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como o extrato enzimático. Este extrato enzimático foi armazenado em congelador para posterior determinação de proteínas totais (*item 3.4.5.1.2*) e da atividade de guaiacol peroxidase (*item 3.4.5.1.3*).

3.4.5.1.2. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas através do método de Bradford (1976). Para tanto, em tubos de ensaio, foi adicionado 5 µL do extrato protéico (*item 3.4.5.1.1*) e neste adicionado 795 µL de tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,0). Em seguida, foi adicionado 200 µL do reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) concentrado em cada um dos tubos de ensaio, contendo os extratos proteicos e o tampão. Após 5 minutos, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva padrão de BSA (0 – 12 µg mL⁻¹) (Apêndice A) foi realizada diluindo-se 0,05 g de BSA em 50 mL de água (1000 µg mL⁻¹).

¹) e este diluído 40 vezes em água novamente (0,1 mL da solução em 3,9 mL de água), ficando com uma concentração de trabalho de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram utilizados para a expressão da atividade específica de guaiacol peroxidase.

3.4.5.1.3. Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada a 470 nm em espectrofotômetro, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (Lusso & Pascholati 1999). A mistura da reação foi composta por 100 μL do extrato proteico diluído (*item 3.4.5.1.1*) e 2,9 mL de solução de reação (250 μL de guaiacol comercial e 306 μL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mL de tampão fosfato de potássio 0,01 M [pH 6,0]). O extrato proteico sofreu uma diluição de 2 vezes em tampão de extração (50 μL do extrato em 100 μL do tampão) para reduzir a atividade, a qual era muito elevada. Na cubeta de referência (branco) utilizou-se 2,9 mL da solução de reação e 100 μL do tampão de extração fosfato 0,01 M (pH 6,0). A solução de reação foi mantida a 30 °C em banho maria. A leitura em espectrofotômetro foi realizada pelo período de 1 minuto. A atividade da peroxidase foi expressa em $\Delta\text{OD}_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}$ de proteína⁻¹. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.5.1.4. Quantificação de fenóis livres e ligados

Para a quantificação de fenóis livres (Kofalvi & Nassuth 1995), amostras do tecido vegetal pesando 0,5 g foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C). Posteriormente, foram maceradas em nitrogênio líquido e o pó resultante da maceração suspenso em 4 mL de metanol 50 % em tubo de ensaio. Após, as amostras foram incubadas a 80 °C por 1 hora e meia em banho maria. Na sequência, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a determinação do conteúdo de fenóis livres pela reação de Folin-Ciocalteu. Para tal reação, adicionou-se 3 mL de Na_2CO_3 (2 %) em 150 μL do extrato obtido anteriormente e aguardou-se 5 minutos. Em seguida foi adicionado 150 μL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (1:1; volume/volume) e aguardou-se por mais 20 minutos. Após, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm. Na cubeta de referência (branco), utilizou-se a mistura de 150 μL de metanol 50 %, 3 mL de Na_2CO_3 (2 %) e 150 μL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:1; volume/volume).

Para a determinação dos fenóis ligados (Kofalvi & Nassuth 1995), o precipitado resultante da centrifugação para a obtenção do extrato de fenóis livres foi armazenado e neste

adicionado 2 mL de NaOH 0,5 M para saponificação dos fenóis ligados a parede. Após 24 horas, a reação foi neutralizada com a adição de 9,5 mL de HCl 2 M, seguida por centrifugação a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e armazenado para a determinação de fenóis ligados através da reação de Folin-Ciocalteu, descrita anteriormente. A cubeta de referência (branco) foi composta por 150 µL coletados da mistura de 2 mL de NaOH 0,5 M e 9,5 mL de HCl 2M, 3 mL de Na₂CO₃ (2 %) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:1; volume/volume).

A concentração de fenóis foi expressa em equivalentes de mg de ácido clorogênico g de tecido fresco⁻¹ (Bray & Thorpe 1954). Para tanto, uma curva padrão de ácido clorogênico (0 – 250 µg) foi confeccionada (Apêndice B) e os valores obtidos com base na equação da curva. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.6. Efeito da aplicação de diferentes potenciais indutores de resistência contra *P. pachyrhizi* em soja, em condições de campo

Buscando estratégias alternativas para o controle da ferrugem-asiática da soja em condições de campo, este experimento foi conduzido para a padronização de metodologias e execução de um experimento preliminar com potenciais indutores.

3.4.6.1. Preparo da área e semeadura

Um campo experimental localizado na cidade de Conchal (22°22'00.4"S 47°10'33.8"W) foi utilizado, no qual foi realizada a semeadura de soja da cultivar Monsoy 7214 IPRO, utilizando-se uma densidade de 644 mil plantas ha⁻¹, devido a semeadura ter sido realizada em um período mais avançado da janela de semeadura recomendado para a região (24/01/2018).

3.4.6.2. Aplicação dos tratamentos

Os tratamentos utilizados foram o controle, suspensão de células de *S. scabies* autoclavada e não autoclavada, filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies*, Acibenzolar-S-metílico e programa com fungicidas. O programa de fungicidas foi preparado conforme a recomendação de cada fabricante para o patossistema e os demais tratamentos preparados conforme o item 3.3. As aplicações dos indutores foram realizadas em cinco datas distintas (07/02; 22/02; 08/03; 22/03; 04/04), respeitando-se o intervalo entre aplicações de aproximadamente 15 dias. Já o programa de fungicidas também foi aplicado em cinco datas

distintas (22/02 – Fluxapirroxade + Piraclostrobina ($167 \text{ g L}^{-1} + 333 \text{ g L}^{-1}$) + Phytogard Mg[®] (Fosfito); 02/03 – Trifloxistrobina + Protiokonazol ($150 \text{ g L}^{-1} + 175 \text{ g L}^{-1}$) + Mancozebe (750 g kg^{-1}); 14/03 – Picoxistrobina + Benzovindiflupir ($100 \text{ g L}^{-1} + 50 \text{ g L}^{-1}$) + Difenokonazol (250 g L^{-1}); 27/03 – Epoxiconazol + Fluxapirroxade + Piraclostrobina ($50 \text{ g L}^{-1} + 50 \text{ g L}^{-1} + 81 \text{ g L}^{-1}$); 16/04 – Azoxistrobina + Benzovindiflupir ($300 \text{ g kg}^{-1} + 150 \text{ g kg}^{-1}$)), entretanto, em datas diferentes as de aplicação dos indutores. As aplicações dos tratamentos foram realizadas com auxílio de um pulverizador costal com pressurização por CO₂.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 5 repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma parcela ($12,5 \text{ m}^2$), onde das 5 linhas semeadas foram avaliadas e colhidas três linhas centrais e desconsiderados 0,5 m de bordadura em cada extremo da parcela.

3.4.6.3. Parâmetros avaliados

Para o acompanhamento da severidade da ferrugem-asiática da soja, foram realizadas visitas periódicas a área. Ao final do ciclo da cultura, a colheita do experimento foi realizada manualmente e a trilha de forma mecânica com equipamento de trilhadeira.

3.4.6.3.1. Severidade

Durante o ciclo da cultura foram realizadas 3 avaliações de severidade da ferrugem asiática da soja com auxílio de uma escala diagramática (Franceschi et al. 2017). A avaliação da severidade foi realizada através da observação de quatro pontos em cada parcela, onde em cada ponto foram atribuídas notas para a severidade do terço inferior, médio e superior das plantas. Após, fez-se a média das notas atribuídas aos três terços das plantas em cada ponto e em seguida feita a média dos quatros pontos avaliados na parcela, constituindo um valor único que foi considerado como a severidade da parcela. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.6.3.2. Produtividade

Ao final do ciclo de cultivo, foi realizada a colheita e a mensuração da massa produzida pelas plantas em cada parcela com auxílio de uma balança. Adicionalmente, fez-se a medição da umidade de cada amostra para posterior correção e padronização da massa, considerando-se que todas as amostras foram corrigidas para a umidade de 13 %. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.6.3.3. Teste de uniformidade (retenção) e qualidade fisiológica de sementes

3.4.6.3.3.1. Teste de retenção em peneiras

O objetivo desta análise foi determinar a porcentagem de sementes retidas em cada peneira utilizada. Para tanto, conforme preveem as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil 2009a) foram pesadas duas alíquotas de 100 g de cada uma das amostras e estas foram submetidas a um conjunto de 10 peneiras com crivos circulares e mais uma base de retenção na parte inferior. As peneiras utilizadas em ordem decrescente foram: 19; 18; 17; 16; 15; 14; 13; 12; 11,5; 11 e a base de retenção. O conjunto de peneiras foi agitado por um minuto e as sementes retidas em cada peneira pesadas em balança analítica para o cálculo de porcentagem de retenção. O valor de retenção médio de cada amostra foi calculado pela média aritmética das duas alíquotas utilizadas de cada amostra. Os resultados foram apresentados em porcentagem de retenção em cada peneira, utilizando-se apenas números inteiros.

3.4.6.3.3.2. Germinação

Os testes de germinação foram conduzidos conforme a RAS (Brasil 2009b). Para tanto, rolos contendo 50 sementes cada foram confeccionados em papel de germinação, o qual foi previamente umedecido em água na proporção de 2,5 vezes o seu peso. A alocação das sementes sobre o papel para confecção dos rolos foi realizada com auxílio de uma placa de contagem perfurada em acrílico. Cada amostra foi submetida a este processo, sendo que foram utilizadas 100 sementes por amostra para a realização deste teste. Após a confecção dos rolos, estes foram submetidos a uma câmara de germinação de sementes, onde permanecerem sob a temperatura de 25 °C e em umidade saturada ($\cong 98\%$) pelo período de 8 dias. A avaliação do número de plântulas normais, plantas anormais, sementes duras e sementes mortas foi realizada por duas vezes, a primeira aos 4 dias e a segunda aos 8 dias. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 5 repetições, onde cada repetição foi composta por dois rolos contendo 50 sementes cada. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.6.3.3.3. Envelhecimento acelerado

O teste de envelhecimento acelerado foi conduzido da maneira tradicional (Marcos Filho 1999), com a utilização de minicâmaras de acrílico do tipo *Gerbox*, contendo em seu interior bandeja com tela de alumínio, sobre a qual foi distribuída uma camada uniforme de

sementes de cada amostra, contendo no mínimo 100 sementes. Na parte inferior da tela de alumínio, foi adicionado um volume de água de 40 mL. Após, as minicâmaras foram incubadas a 41 °C pelo período de 48 horas em escuro. Em seguida, 100 sementes de cada amostra foram submetidas ao teste de germinação, descrito no *item 3.4.6.4.3.2*. A avaliação da porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes duras e sementes mortas foi realizada após 4 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 5 repetições, onde cada repetição foi composta por dois rolos de germinação contendo 50 sementes cada. O resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.4.7. Obtenção do fator de retenção (R_f) da taxtomina purificada através de cromatografia de camada delgada (TLC)

Para a obtenção do R_f da taxtomina purificada (TPU), fez-se o uso do método da cromatografia de camada delgada (“*Thin Layer Chromatography*”- TLC) (Goyer et al. 1998), onde utilizou-se placa de sílica (Sigma-Aldrich) gel 60 com espessura de 250 μm , na qual a TPU em metanol foi aplicada. Para separação, o solvente utilizado foi o clorofórmio-metanol 9:1 (volume/volume). O R_f foi obtido através da relação entre a distância percorrida pela TPU e a distância percorrida pelo solvente. A amostra de TPU utilizada neste procedimento foi cedida pelo Dr. Russel R. King (Agriculture & Agri-Food Canada, Research Branch, Fredericton Research Center – Fredericton, Canadá). Fez-se o depósito de 100 μL de TPU na placa em um ponto e no segundo ponto fez-se o depósito de 100 μL de metanol (controle). A leitura da placa foi realizada sob luz ambiente, devido a coloração amarela apresentada pela TPU e também em câmara escura equipada com luz UV (365 nm).

3.4.8. Efeito da aplicação de taxtomina parcialmente purificada (TPP) e taxtomina purificada (TPU) na expressão gênica em plantas de soja

Para a realização deste experimento, inicialmente plantas foram obtidas conforme *item 3.1* e mantido apenas uma planta por vaso. Os tratamentos foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio V1. Os tratamentos utilizados neste experimento foram: controle negativo, TPP 100 μg equivalente mL^{-1} e TPU 100 μg mL^{-1} . Os tratamentos controle negativo e TPP 100 μg equivalente mL^{-1} foram aplicados através de aspersão até o ponto de escoamento. Já o tratamento TPU 100 μg mL^{-1} foi aplicado através de microgotas (5 microgotas de 30 μL sobre cada folha do unifólio) devido a limitação de volume disponível.

Após 24 horas, procedeu-se com a coleta das duas folhas de cada planta, acondicionamento imediato em nitrogênio líquido e armazenamento em ultrafreezer (- 80 °C).

Para a extração de RNA das amostras, seguiu-se o método do Trizol[®] e para a síntese de cDNA seguiu-se a metodologia proposta pela fabricante para o kit PROMEGA First Strand cDNA. Os genes monitorados foram MeSA, NPR1, PR1 (ácido salicílico), MYC2 (jasmonato), ACC e ERF1 (etileno). Considerou-se como regulados positivamente os genes que apresentaram valores de expressão superiores a 1 e como regulados negativamente os genes que apresentaram valores inferiores a 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do efeito direto *in vitro* dos agentes sobre urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Todos os tratamentos apresentaram efeito sobre a germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* (Tabela 3). Os tratamentos acibenzolar-S-metílico, meio-aveia sem *Streptomyces scabies*, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e meio com suspensão de células não autoclavado reduziram a germinação, entretanto, em baixas proporções (10 – 20 %). Já o tratamento filtrado do meio de *Streptomyces scabies* foi capaz de reduzir a germinação em um índice maior do que os tratamentos citados anteriormente, atingindo uma germinação de 76 %. No que diz respeito a taxtomina parcialmente purificada, a mesma reduziu a germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*, para 36 %, sendo o segundo melhor tratamento entre todos os testados. Já o tratamento fungicida, como já esperado, foi o que se destacou entre todos e diferiu dos demais estatisticamente, inibindo completamente a germinação em ambos os experimentos realizados.

Dentre todos os resultados obtidos, ressalta-se o potencial de inibição de germinação demonstrado pela taxtomina parcialmente purificada (61%). Esta fitotoxina demonstrou ter um efeito significativo sobre a inibição da germinação dos urediniósporos (Tabela 3 e Figura 7) de *P. pachyrhizi*, o que pode significar uma nova alternativa para o controle deste patógeno. Cabe destacar que a taxtomina parcialmente purificada nunca foi testada anteriormente quanto ao seu efeito direto sobre *P. pachyrhizi*.

Em se tratando do efeito direto parcial verificado para o Acibenzolar-S-metílico, não há uma explicação clara na literatura sobre como se dá tal efeito. Alguns trabalhos relatam inibições de crescimento micelial e também da germinação de esporos (Osswald et al. 2004; Pereira et al. 2008; Nojosa et al. 2009; Santos et al. 2013). De maneira geral, os relatos de efeito direto do Acibenzolar-S-metílico são escassos e as conclusões encontradas são desfavoráveis a ocorrência deste efeito (Soares et al. 2008).

Em relação a redução parcial da germinação pelo meio-aveia sem *Streptomyces scabies*, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e não autoclavado, tal efeito pode ser atribuído a existência de algum componente desconhecido no meio-aveia que possui a capacidade de afetar a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Para o meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e não autoclavado também há a presença da fitotoxina taxtomina, que apesar de não estar purificada

ou parcialmente purificada, possivelmente esteja demonstrando seu potencial de efeito direto de maneira reduzida.

Já o filtrado do meio de *Streptomyces scabies*, o qual foi capaz de inibir a germinação em 19 %, o mesmo apresenta um efeito mais pronunciado possivelmente por já ter passado por um processo de filtração e possuir os metabólitos secundários produzidos por *S. scabies* durante o seu cultivo livre das células. A ação de filtrados de microrganismos já é estudada e conhecida a alguns anos, bem como a capacidade de produção de metabólitos secundários e suas funções (Keel et al. 1990; Yarbrough et al. 1993; Hallmann e Sikora 1996). A capacidade de produzir enzimas, inibidores enzimáticos e antibióticos por actinomicetos, aos quais *Streptomyces* pertence também já foi relatada na literatura (Willians e Vickens 1988). Entretanto, apesar dos relatos existentes, não há informações que possibilitem explicar de maneira precisa o efeito do filtrado de *S. scabies* na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

Em relação ao efeito direto sobre a germinação de *P. pachyrhizi* apresentado pela TPP, não existem informações específicas na literatura. Todavia, são encontradas relatadas na literatura inúmeras informações relacionadas a substâncias com potencial de controlar microrganismos, destacando-se inibidores de síntese de ergosterol, proteínas, ácidos nucleicos, mitose, respiração, síntese de parede celular e disruptores de função da membrana plasmática (Carlile et al. 2001). Cabe destacar ainda que os resultados encontrados nos experimentos descritos nesta dissertação contrariam resultados existentes na literatura em relação ao efeito direto sobre *Phytophthora nicotianae* e *P. plurivora* (Brand 2016). Em contrapartida, corroboram com os resultados encontrados relacionados ao efeito direto da TPP sobre *Colletotrichum sublineolum* (Garcia et al. 2008b) e *Rhizopus stolonifer* (Pinto 2014).

O tratamento com picoxistrobina + benzovindiflupir utilizado foi capaz de inibir completamente a germinação, conforme já esperado. Por se tratar de um produto comercial e com o modo de ação já esclarecido, foi utilizado com o intuito principal de se ter um parâmetro positivo de comparação para a inibição da germinação. O fungicida utilizado é um produto sistêmico composto por picoxistrobina, pertencente as estrobilurinas, que atua na inibição da quinona externa do complexo III e por benzovindiflupir, pertencente ao grupo químico pirazol carboxamida, que atua na inibição da succinato desidrogenase no complexo II. Ambos atuam como inibidores do fluxo de elétrons na respiração mitocondrial, em pontos diferentes e, portanto, apresentam efeito direto sobre patógenos. Portanto, sabendo-se do modo de ação do FGC utilizado, a inibição total da germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* pode ser esclarecida.

Ademais, apesar de todos os tratamentos terem apresentado algum efeito deletério sobre a germinação, vale ressaltar o excelente resultado apresentado pela TPP neste parâmetro, por se tratar de uma preparação ainda bruta e não formulada. Portanto, considerando-se a concentração e condição testadas, a TPP demonstrou potencial para ser utilizada também como um composto com ação direta sobre o agente causal da ferrugem-asiática da soja.

Tabela 3: Percentual de germinação e inibição da germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* submetidos ao controle negativo, acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado e não autoclavado, filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies*, taxtomina parcialmente purificada ($100 \text{ } \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) e fungicida ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$).

Tratamento	Germinação (%)*	Inibição da germinação (%)
Controle negativo	94 a	-
Acibenzolar-S-metílico	85 b	9
Meio-aveia sem <i>Streptomyces scabies</i>	84 b	11
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado	83 b	11
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> não autoclavado	83 b	11
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	76 c	19
Taxtomina parcialmente purificada	36 d	61
Fungicida	0 e	100

*Para o parâmetro de germinação de urediniósporos (%), médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste de Tukey a $p \leq 0,05$.

Figura 7: Urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* com a germinação inibida (A) em função da aplicação de fungicida ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$) e urediniósporos com germinação normal (B) no controle negativo (B). As setas indicam a presença de tubo germinativo (TG) e apressório (AP).

4.2. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Sabendo-se do efeito direto que a taxtomina parcialmente purificada apresentou sobre a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, uma curva dose-resposta foi realizada para se constatar até que concentração há efeito direto da taxtomina parcialmente purificada e a variação deste efeito em função da concentração utilizada. Conforme pode ser visualizado na figura 8, o aumento da concentração de taxtomina parcialmente purificada reduziu a germinação de urediniósporos (Figura 8). Tal fato pode ser constatado a medida que na menor concentração testada ($25 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) há uma redução de 4 % na germinação e a medida que a concentração aumenta, ocorre a redução na germinação. Há uma resposta em função da concentração que se encerra quando a taxtomina parcialmente purificada foi utilizada na concentração de $200 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, onde houve a inibição total da germinação. Portanto, considerando uma curva de dose-resposta para a germinação, a concentração máxima de taxtomina parcialmente purificada que deve ser usada é de $200 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$, pois a partir desta concentração a resposta na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* permanecerá inalterada. Além disso, cabe destacar que todas as concentrações testadas apresentaram algum efeito inibitório crescente na germinação em função das concentrações de taxtomina parcialmente purificada.

Figura 8: Percentual de germinação *in vitro* de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em função de concentrações crescentes de taxtomina parcialmente purificada.

4.3. Efeito da taxtomina parcialmente purificada sobre urediniósporos de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas

Conforme visto no *item 4.1*, há efeito direto da taxtomina parcialmente purificada sobre *P. pachyrhizi* e, além disso, a taxtomina parcialmente purificada é capaz de inibir completamente a germinação quando utilizada na concentração de 200 µg equiv. mL⁻¹. Entretanto, até este momento não se tinha conhecimento se o efeito que a fitotoxina expressa sobre o patógeno era temporário ou definitivo.

Como pode ser visto na figura 9 e 10, o efeito da taxtomina parcialmente purificada pode ser deletério, mas varia em função do tempo de exposição. Portanto, quando os urediniósporos de *P. pachyrhizi* são expostos a taxtomina parcialmente purificada e em seguida inoculados em folha destacada, há uma redução na severidade da doença que varia em relação ao tempo que os urediniósporos permaneceram em contato direto com a taxtomina parcialmente purificada. Logo, quando os urediniósporos foram expostos por 50 minutos, houve a redução do número de pústulas de 68 % (19 pústulas cm⁻² [controle] para 6 pústulas cm⁻² [taxtomina parcialmente purificada 200 µg equiv. mL⁻¹]) e quando expostos por 90 min, a severidade foi reduzida em 80 % (10 pústulas cm⁻² [controle]) para 2 pústulas cm⁻² [taxtomina parcialmente purificada 200 µg equiv. mL⁻¹] (Figura 9). Logo, a taxtomina parcialmente purificada diferiu estatisticamente do controle, reduzindo a severidade neste experimento. Contudo, pode-se observar que não houve a inibição total da germinação como observado no experimento anterior em que o tempo de exposição dos urediniósporos a taxtomina parcialmente purificada foi de 8 horas (*item 4.3*), mas cabe ressaltar que o tempo de exposição dos urediniósporos a taxtomina parcialmente purificada foi cerca de 9,6 e 5 vezes menor considerando a exposição por 50 e 90 min, respectivamente, em relação ao experimento anterior. Portanto, é possível observar que apesar de existir o efeito direto de taxtomina parcialmente purificada na concentração de 200 µg equiv. mL⁻¹, tal efeito é dependente do tempo em que os urediniósporos permanecem expostos. Além disso, em tempos menores de exposição (50 e 90 min), uma parcela dos esporos é afetada pela fitotoxina, entretanto, a outra parcela não sofre o efeito da taxtomina parcialmente purificada e permanece capaz de infectar e colonizar os tecidos das folhas de soja.

O número de pústulas observados neste experimento fica muito abaixo dos valores que podem ocorrer, onde pode-se constatar até 26 lesões e 46 urédias por cm² de tecido vegetal em condições controladas (Garcés et al. 2010a). Em condições de campo, pode-se observar até 232 lesões e 375 urédias por cm² de tecido (Garcés et al. 2010b).

Com a redução do número de pústulas formadas em relação ao controle observadas neste experimento, pode-se destacar que além da taxtomina parcialmente purificada possuir efeito direto sobre *P. pachyrhizi*, este efeito é variável em função do tempo em que o urediniósporos permanecem expostos a fitotoxina parcialmente purificada.

Figura 9: Severidade em folhas destacadas de soja 12 dias após a inoculação com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* previamente tratados com o controle negativo e taxtomina parcialmente purificada em diferentes intervalos de tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste t-Student a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

Figura 10: Formação de pústulas em folhas de soja destacadas observada 12 dias após a inoculação com suspensão de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* submetidos ao controle negativo e a taxtomina parcialmente purificada (200 µg equiv. mL⁻¹) durante intervalos de tempo de 50 minutos (A e B) e 90 minutos (C e D), respectivamente.

4.4. Efeito de diferentes preparações de potenciais indutores de resistência aplicados em folhas destacadas, no controle de *P. pachyrhizi*

No que diz respeito a indução de resistência em folhas destacadas, os resultados demonstram que dois tratamentos testados foram superiores aos demais, sendo capazes de reduzir significativamente a severidade da doença (Tabela 4 e Figura 11). Conforme foi possível observar nos dados obtidos (Tabela 4), enquanto que no controle a formação de pústulas cm^{-2} atingiu o valor de 37,5, para os tratamentos Acibenzolar-S-metílico e taxtomina parcialmente purificada este valor foi de 12,5 e 10,6, respectivamente. Estes dois tratamentos diferiram do controle e de todos os demais tratamentos. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do controle.

O tratamento Acibenzolar-S-metílico é um produto químico análogo fisiológico do ácido salicílico sintetizado e apresenta indução de respostas de defesa em plantas (Katz et al. 1998; Kohler et al. 2002). Tal produto foi então introduzido como um ativador de plantas e é comercializado no Brasil, sendo que este apresenta uma atividade protetora e não curativa (Goellner e Conrath 2008). Como visto neste experimento, a atividade protetora deste produto está possivelmente ligada a indução de mecanismos de defesa da planta. Conforme relatado na literatura, os produtos pertencentes ao grupo benzothiadiazole, como o Acibenzolar-S-metílico, podem alterar a ativação de genes ligados a regulação de níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e também na geração de espécies reativas de oxigênio (lipoxigenase, oxalato oxidase e peroxidase) (Tokunaga et al. 1998). Em outro estudo realizado com tomateiro, observou-se que a aplicação de Acibenzolar-S-metílico foi capaz de elevar a atividade de peroxidases e oxidases de polifenóis que podem estar envolvidas no processo de lignificação, tendo início poucas horas após a aplicação e persistindo por até 12 dias após a aplicação (Cavalcanti et al. 2006). Tais resultados demonstram que a redução da severidade observada neste experimento se deve possivelmente a alterações nos mecanismos de defesa e que estas alterações podem ter ocorrido e persistido durante todo o período de 12 dias da realização do experimento, conforme já observado em outro patossistema (Cavalcanti et al. 2006).

Com relação a taxtomina parcialmente purificada, a qual foi capaz de reduzir a severidade drasticamente e se igualar estatisticamente ao indutor comercial Acibenzolar-S-metílico, os mecanismos de ação da mesma ainda encontram-se sendo estudados para cada patossistema, uma vez que os seus efeitos podem variar em função da planta e concentração utilizadas (Brand 2016). Entretanto, estudos anteriores com sorgo demonstram que a taxtomina purificada foi capaz de aumentar a atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -

1,3 glucanase, onde reduziu em 80 % a severidade de *C. sublineolum* (Garcia et al. 2008b). Além disso, em outro estudo com plântulas de citros, verificou-se que a taxtomina parcialmente purificada (100 µg equiv. mL⁻¹), na mesma concentração utilizada neste experimento, e o Acibenzolar-S-metílico foram capazes de aumentar a atividade da enzima β-1,3 glucanase em folhas e ainda houve a indicação de um possível efeito sistêmico de defesa nas plantas tanto para o indutor comercial quanto para a taxtomina parcialmente purificada (Brand 2016).

Ademais, a fitotoxina taxtomina pode afetar a velocidade de ocorrência de influxo de Ca²⁺, sendo que este é dito como um mensageiro chave para a reação quando patógenos infectam plantas (Tegg et al. 2005; Errakhi et al. 2008). Em *A. thaliana*, a resposta é a morte celular programada (Duval et al. 2005), sendo que a sinalização por cálcio, desencadeada como resposta aos PAMPs, acarreta no aumento do nível de Ca²⁺ citosólico, que por sua vez é essencial na indução de defesas e respostas oxidativas (Gerber et al. 2004; Kurusu et al. 2005). O Ca²⁺ dentro de sua função de mensageiro chave pode participar na deposição de calose, regulação da síntese de fitoalexinas, estabilidade de membranas, integridade celular e ativação de várias enzimas (Resende et al. 2006).

Portanto, baseando-se nas informações disponíveis na literatura, acredita-se que a redução da severidade observada neste experimento é consequência da ativação de mecanismos de defesa através da aplicação da taxtomina parcialmente purificada, bem como do Acibenzolar-S-metílico.

Com relação ao tratamento picoxistrobina + benzovindiflupir (3,33 mL L⁻¹ p. c.), apesar de que o fabricante destaca na bula do produto a inexistência de problemas relacionados a fitotoxidez para as culturas indicadas, o mesmo ocasionou um dano severo na folha, deixando a mesma com aspecto de albinismo e desta forma impossibilitando a realização de qualquer tipo de avaliação (Figura 11, H).

Tabela 4: Severidade, índice de esporulação e percentual de germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas destacadas de soja.

Tratamento	Pústula cm ⁻² * (% inibição)	Esporos mL ⁻¹	Germinação (%)
Controle negativo	37,5 a (0,0)	6,34 x 10 ⁴ n.s.	81,8 n.s.
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> não autoclavado	36,9 a (1,6)	1,60 x 10 ⁴	80,4
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	33,3 a (11,2)	1,18 x 10 ⁴	74,6
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado	31,2 a (16,8)	3,86 x 10 ⁴	80,8
Meio-aveia sem <i>Streptomyces scabies</i>	22,7 a (39,5)	3,24 x 10 ⁴	75,2
Acibenzolar-S-metílico	12,5 b (66,7)	9,60 x 10 ³	78,2
Taxtamina parcialmente purificada**	10,6 b (71,7)	5,60 x 10 ³	77,0
Picoxistrobirna + benzovindiflupir***	-	-	-
CV (%)	12,81	11,96	7,62

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a p ≤ 0,05 de significância

**Utilizada na concentração de 100 µg equiv. mL⁻¹

***Avaliação impossibilitada devido a ocorrência de possível fitotoxidez

Quando observada a produção de urediniósporos e a germinação, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Apesar da redução significativa na formação de pústulas em dois tratamentos, a produção de urediniósporos por lesão não foi afetada. Além disso, os tratamentos aplicados não foram capazes de influenciar na germinação dos urediniósporos produzidos nas folhas tratadas.

Figura 11: Lesões de ferrugem-asiática em folhas destacadas de soja submetidas ao controle negativo (A), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavado (B), filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies* (C), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado (D), meio-aveia sem *Streptomyces scabies* (E), acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (F), taxtomina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) (G) e Picoxistrobina + Benzovindiflupir ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$) (H) 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

4.5. Efeito dos diferentes tratamentos na severidade e respostas bioquímicas de plantas de soja à *P. pachyrhizi* em condições de casa de vegetação

4.5.1. Severidade

Conforme pode ser observado (Figura 12 e 13), não houve diferença estatística entre os tratamentos controle, taxtomina parcialmente purificada e Acibenzolar-S-metílico em ambos os experimentos realizados em condições de casa de vegetação. Dentre os tratamentos testados, o único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais foi o picoxistrobina + benzovindiflupir, tanto no primeiro quanto no segundo experimento. Ao contrário dos resultados obtidos no experimento anterior em folha destacada, nestes experimentos os tratamentos taxtomina parcialmente purificada e Acibenzolar-S-metílico não se mostraram eficientes em reduzir a severidade de *P. pachyrhizi*.

Figura 12: Severidade em trifólios de plantas após a aplicação dos tratamentos e inoculação com suspensão de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. A coluna azul representa os dados obtidos no Experimento I, enquanto que a coluna vermelha representa os dados obtidos no Experimento II. A taxtomina parcialmente purificada foi utilizada na concentração de 100 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$. Os tratamentos dentro de cada experimento seguidos pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

O Acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) é um produto comercial de demonstrou bons resultados em testes *in vitro* juntamente com a taxtomina parcialmente purificada na redução da severidade de *P. pachyrhizi*, mas não em casa de vegetação. O Acibenzolar-S-metílico já tem sua eficiência no controle de doenças amplamente difundida em diversos patossistemas (Cavalcanti et al. 2006; Pereira et al. 2008, 2009b; Nojosa et al. 2009; Cruz et al. 2013), com reduções de incidência de até 90 % de *Hemileia vastatrix* em cafeeiro (Guzzo et al. 2001) e utilização combinada com programas de controle químico em soja (Dallagnol et al. 2006), apesar de não ser registrado para a cultura e não possuir recomendação oficial.

No presente estudo utilizou-se a concentração recomendada para a cultura do feijão ($0,166 \text{ g L}^{-1}$ p.c.). Todavia, estudos que demonstram a eficiência do Acibenzolar-S-metílico no controle da doença, de maneira geral, utilizam concentrações bastante superiores, como $0,41 \text{ g L}^{-1}$ (p.c.) (Dallagnol et al. 2006) e $1,25 \text{ g L}^{-1}$ (p.c.) (Duarte et al. 2009). Por outro lado, estudo realizado com *P. pachyrhizi* e Acibenzolar-S-metílico demonstrou concentrações menores também podem atuar na redução da severidade da doença ($0,02 \text{ g L}^{-1}$) (Pereira et al. 2009a). Em outro estudo, observou-se que uma dose similar ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) a que foi utilizada nestes experimentos foi capaz de reduzir em 36,5 % a área abaixo da curva de progresso do número de lesões de cercosporiose em cafeeiro (Pereira et al. 2008). Portanto, pode-se observar que há diferentes respostas em função da dose de Acibenzolar-S-metílico utilizada, sendo que além disso podem haver variações das respostas em função da espécie e cultivar da planta utilizada nos experimentos.

Outro fator que deve ser destacado é o intervalo de tempo entre a aplicação do produto e o desafio com o patógeno. Os tempos utilizados em outros experimentos relatados variam de horas até inúmeros dias (Pereira et al. 2008), podendo ocorrer diversas aplicações durante o ciclo da cultura (Duarte et al. 2009), o que também influencia na expressão das respostas de defesa das plantas. Para soja, mais especificamente, estudo realizado demonstra a redução de 65,5 % da severidade pela aplicação de Acibenzolar-S-metílico, onde a inoculação com *P. pachyrhizi* foi realizada 24 horas após a aplicação do indutor (Pereira et al. 2009a), o que ressalta que a potencialização dos mecanismos de defesa e a sua duração podem ser bastante variáveis em função do patossistema estudado.

Portanto, sabendo-se das variações que podem ocorrer, não foi possível a obtenção de uma conclusão a respeito dos motivos pelos quais o tratamento Acibenzolar-S-metílico não foi eficiente em reduzir a severidade de *P. pachyrhizi* nestes experimentos. Supõe-se que os resultados observados neste experimento em condições de casa de vegetação não corroboram com os resultados encontrados em folha destacada por alguns motivos, como, por exemplo, temperatura, umidade e luz. As condições de temperatura e umidade em condições de casa de vegetação podem oscilar frequentemente, o que não ocorre em testes em condições controladas. Em relação a luz, enquanto que em condições controladas se utiliza de luz artificial, em casa de vegetação as plantas permanecem sob os efeitos da luz natural, o que pode resultar em diferenças no desenvolvimento e resposta das plantas frente a aplicação de produtos. Conforme já observado (Pascholati 2000²), quando da aplicação de Acibenzolar-S-

² Comunicação pessoal do Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ/USP).

metílico e a realizada a manutenção de plantas sob luz artificial a luz natural, diferenças importantes foram detectadas.

A taxtomina parcialmente purificada também já tem sua ação como indutor de resistência relatada para diversos patossistemas (Garcia et al. 2007b, 2008b, a; Lerat et al. 2009; Pinto 2014; Joglekar et al. 2018), mas cabe ressaltar que a sua eficiência é variável em função da planta, concentração e condições testadas (Brand 2016). Apesar de já ter sido relatada a capacidade da taxtomina parcialmente purificada alterar a atividade de enzimas como peroxidases, quitinases, β -1,3 glucanases, alterar influxo de Ca^{2+} , ocasionar morte celular programada em *A. thaliana* e mediar a redução da severidade em inúmeros patossistemas (Tegg et al. 2005; Garcia et al. 2008b; Errakhi et al. 2008; Pinto 2014; Brand 2016), inclusive apresentando possível efeito sistêmico (Brand 2016), os resultados observados neste experimento não seguem nesta mesma linha. Sendo assim, apesar de ter apresentado resultados interessantes em testes *in vitro*, possivelmente necessite de adaptações de concentração de trabalho para que se obtenham resultados adequados também em casa de vegetação. Como comentado, deve-se considerar ainda que a temperatura, umidade e radiação solar são outras características que diferenciam as condições em que o experimento em casa de vegetação foi realizado em comparação aos experimentos realizados *in vitro*.

Existem inúmeros potenciais microrganismos e/ou moléculas de controle alternativo que exibem boa eficiência em condições controladas, mas que, por vezes, necessitam de adaptações para que resultados similares aos obtidos *in vitro* possam ser reproduzidos em condições de casa de vegetação ou campo. Acredita-se que a taxtomina parcialmente purificada faz parte deste grupo, uma vez que já tem o seu potencial comprovado em outros patossistemas e *in vitro* para *P. pachyrhizi*, necessitando que modificações pontuais sejam realizadas e testadas para que os resultados obtidos em condições controladas possam ser reproduzidos em condições de casa de vegetação e campo.

Em relação ao tratamento fungicida, trata-se de um produto comercial utilizado como controle positivo nos experimentos. Este produto tem em sua composição a picoxistrobina, que atua como inibidor da quinona externa (QoI) combinado com o benzovindiflupir que atua como inibidor da succinato desidrogenase (SDHI) (Silva e Behlau 2018). A picoxistrobina pertence ao grupo das estrobilurinas que atualmente são uma das principais classes de fungicidas, sendo que combinadas aos triazóis respondem por grande parte dos agrotóxicos consumidos mundialmente em culturas importantes (Silva e Behlau 2018). Os QoIs agem por inibição do transporte de elétrons no complexo III mitocondrial e tem amplo espectro sobre ascomicetos, alguns basidiomicetos e oomicetos (Silva e Behlau 2018). Já o benzovindiflupir,

uma pirazol-carboxamida tem seu registro ligado a mistura com estrobilurinas para controle de importantes doenças como ferrugens, que tem sua atuação ligada ao complexo II da respiração (Silva e Behlau 2018).

A partir da disponibilização das pirazóis-carboxamidas em 2010, este grupo passou a ser um dos mais importantes para controle da ferrugem-asiática da soja em conjunto com os QoIs e os DMIs (Silva e Behlau 2018). A combinação de picoxistrobina + benzovindiflupir comercializada sob o nome de Vessarya[®] pela empresa DuPont[™] demonstrou o melhor nível de controle nos experimentos realizados em casa de vegetação. Este mesmo produto quando testado em condições de campo durante a safra 2017/2018 em diversos locais, também mostrou-se como um dos tratamentos mais eficientes no que diz respeito a redução da severidade de *P. pachyrhizi*, sendo capaz de apresentar um controle de 73 % (Godoy et al. 2018).

Portanto, como pode ser observado nestes experimentos, em condições de casa de vegetação os tratamentos taxtomina parcialmente purificada (TPP) e acibenzolar-S-metílico não foram eficientes e apenas o tratamento fungicida foi capaz de reduzir a doença.

Figura 13: Lesões de ferrugem-asiática em trifólios de soja coletados dos experimentos I e II, os quais foram submetidos ao controle negativo (A), taxtamina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (B), acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (C) e fungicida ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$) (D) 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

4.5.2. Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade de guaiacol peroxidase foi verificada e observou-se que apenas um dos tratamentos aplicados apresentou a capacidade de alterar a atividade desta enzima em relação ao controle 120 horas após a aplicação, ou seja, 48 horas após a inoculação com urediniósporos de *P. pachyrhizi* (Figura 14 A e B). Uma elevação acentuada na atividade de guaiacol peroxidase ocorreu apenas no tratamento taxtamina parcialmente purificada que recebeu a inoculação (Taxtamina parcialmente purificada+*Phakopsora pachyrhizi*), sendo este o único a diferir estatisticamente dos demais tratamentos.

O aumento da atividade de peroxidase pela aplicação da taxtomina parcialmente purificada já foi verificado para sorgo (Garcia et al. 2008b) e neste estudo para soja. O aumento da atividade da peroxidase pode estar ligado a suberização, lignificação e metabolismo da parede celular (Guzzo 2003). A ocorrência da lignificação pode impedir ou retardar a ocorrência da doença através do estabelecimento de uma barreira mecânica, aumentando a resistência da parede celular ao ataque de enzimas hidrolíticas ou a difusão de toxinas liberadas pelos patógenos (Vance et al. 1980; Cavalcanti et al. 2005a). A taxtomina também pode acelerar o influxo de Ca^{2+} que por sua vez age como um mensageiro chave na reação de plantas ao ataque de patógenos (Tegg et al. 2005; Errakhi et al. 2008).

Como observado nos resultados, o tratamento taxtomina parcialmente purificada apenas elevou a atividade da peroxidase quando inoculado e isso pode indicar a ocorrência de um possível fenômeno de *priming*. Ou seja, quando da ocorrência deste fenômeno, a planta ao receber a aplicação do indutor permanece sensibilizada e passa a expressar suas defesas em proporções maiores quando percebe o ataque de um patógeno em potencial (Goellner e Conrath 2008). O fenômeno de *priming* pode ser durável e se manter durante todo o ciclo de vida da planta ou ainda, pode ser transgeracional, demonstrando a existência de algum tipo de memória imunológica por parte das plantas (Mauch-Mani et al. 2017).

A indução de resistência de maneira geral tem um custo metabólico para as plantas e o fenômeno de *priming* também está inserido nesta regra. Todavia, o custo metabólico de plantas em estado de *priming* é significativamente menor do que plantas induzidas diretamente e sob o ataque de patógenos, visto que plantas sensibilizadas respondem melhor do que plantas não sensibilizadas somente na presença do agressor (van Hulten et al. 2006).

Embora tenha sido observada a alteração na atividade de peroxidase em função do tratamento taxtomina parcialmente purificada e a existência de um possível fenômeno de *priming*, tal fato não foi suficiente em reduzir a severidade da ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação. Vale ressaltar que as peroxidases apresentam um alto número de isoformas, com regulação da sua expressão bastante heterogênea e estão envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos ao longo de todo o ciclo da planta, além do sistema de defesa (Passardi et al. 2005). Ademais, o acúmulo de compostos com ação sobre patógenos em consequência do contato de plantas com taxtomina pode variar, como no caso de acúmulo da fitotoxina escopoletina em fumo, onde o pico de acúmulo é atingido após 4 dias, sendo que 2 dias após há um grande decréscimo (Lerat et al. 2009).

No que diz respeito ao tratamento com Acibenzolar-S-metílico, que apresentou bons resultados em testes *in vitro* na redução da severidade da ferrugem-asiática, o mesmo não foi

capaz de alterar significativamente a atividade enzimática tanto com a inoculação ou na ausência do patógeno. Conforme observado por Cruz et al. (2013), quando verificada a atividade de peroxidase em plantas de soja que foram tratadas com Acibenzolar-S-metílico e inoculadas com *P. pachyrhizi*, estas apresentaram atividade enzimática inferior as inoculadas quando quantificada a atividade 48 horas após a inoculação. Entretanto, 72 horas após a inoculação a atividade enzimática se iguala tanto para plantas inoculadas quanto para plantas não inoculadas. Apesar do exposto, neste experimento em que a atividade de peroxidase foi quantificada 48 horas após a inoculação, não foram observadas diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas no tratamento Acibenzolar-S-metílico.

Outros autores (Duarte et al. 2009; Cruz et al. 2013; Holz et al. 2018³) utilizando concentrações maiores de Acibenzolar-S-metílico (p. c.) (1,25 g L⁻¹, 0,41 g L⁻¹ e 1,66 g L⁻¹, respectivamente) obtiveram resultados em que houve a redução da severidade da ferrugem-asiática, inclusive possibilitando a comparação com fungicidas protetores. Além disso, quando utilizado 0,4 g L⁻¹, o Acibenzolar-S-metílico foi capaz de aumentar a atividade de quitinase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase, mas não alterou a atividade de peroxidase em plantas de soja (Cruz et al. 2013). Em concentrações menores, como 0,02 g L⁻¹, o Acibenzolar-S-metílico foi capaz de elevar a atividade de β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase, entretanto, a atividade de peroxidase permaneceu inferior ao controle (Pereira et al. 2009b).

Devido as recorrentes observações das altas atividades de fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação de Acibenzolar-S-metílico, sugere-se que a via dos fenilpropanóides tem grande importância e, que além da fenilalanina amônia-liase, a quitinase e a β -1,3 glucanase estão envolvidas no processo de redução dos sintomas da ferrugem-asiática (Cruz et al. 2013). Cabe destacar que a elevação da atividade da fenilalanina amônia-liase em resposta a aplicação do Acibenzolar-S-metílico também já foi observada em outros patossistemas (Saravanan et al. 2004; Rodrigues et al. 2006). Todavia, como observado nos resultados de alguns estudos supracitados e no presente experimento, o Acibenzolar-S-metílico não foi capaz de alterar a atividade da peroxidase.

³ Comunicação pessoal de Sabrina Holz (ESALQ/USP).

Figura 14: Atividade de guaiacol peroxidase quantificada em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Os tratamentos foram: controle negativo (AGU), controle negativo + *Phakopsora pachyrhizi* (AGU+FAS), taxtomina parcialmente purificada (TPP), taxtomina parcialmente purificada + *Phakopsora pachyrhizi* (TPP+FAS), Acibenzolar-S-metílico (BIO), acibenzolar-S-metílico + *Phakopsora pachyrhizi* (BIO+FAS), fungicidas (FGC) e fungicidas + *Phakopsora pachyrhizi* (FGC+FAS). As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

4.5.3. Quantificação de fenóis livres e ligados

Com relação a determinação dos fenóis livres (Figura 15), verificou-se que nenhum dos tratamentos ocasionou alterações significativas tanto após a aplicação dos indutores (72 h) quanto após a inoculação (120 h). Já para fenóis ligados (Figura 16) houve diferença entre os tratamentos apenas após a inoculação (120 h). Todos os tratamentos utilizados diferiram dos tratamentos utilizados como controle (controle e controle+*Phakopsora pachyrhizi*). Portanto, os tratamentos apresentaram a capacidade de alterar significativamente o acúmulo de fenóis ligados, apresentando resultados estatisticamente iguais quando inoculados ou não inoculados. Tal fato demonstra que esta resposta ocorreu independentemente do contato com o patógeno, ao contrário do que ocorreu com a peroxidase.

Metabólitos secundários como os ácidos fenólicos, flavonoides e triterpenóides são produzidos em grandes quantidades para proteger plantas de infecções (Yusnawan et al. 2018). Diversos fitopatógenos podem ser inibidos por estes compostos e dentre estes está a *P. pachyrhizi* (Lygin et al. 2009).

O acúmulo de produtos na via dos fenilpropanóis é descrito como um fato importante na defesa de plantas (Bate et al. 1994) e a elevação na quantidade de fenóis totais está relacionado a formação de uma barreira física e química que atua no processo de invasão do fitopatógeno (Ballester et al. 2013). O acúmulo de compostos fenólicos e lignina, por exemplo, pode ser ocasionado pela aplicação de eliciadores que são capazes de afetar as plantas de maneira que estas desencadeiam resposta de defesa complexas (Sudhamoy 2010). A aplicação de quitosana em tomate resultou na elevação dos compostos fenólicos e proporcionou a proteção contra *Passalora fulva* (Liu et al. 2007).

Dentre os compostos fenólicos com importância para a soja está a fitoalexina gliceolina, pois a mesma apresenta a capacidade de inibir a germinação e o desenvolvimento de *P. pachyrhizi*, além de melhorar a resistência das plantas a ferrugem-asiática e também a outros patógenos (Lygin et al. 2009). Além da gliceolina, a lignina é um polímero aromático presente na parede da célula vegetal que atua como uma barreira de entrada a fungos no tecido e a difusão de enzimas secretadas por estes microrganismos, visando a degradação da parede para facilitar o processo de infecção (Vance et al. 1980; Egea et al. 2001; Calvo et al. 2008). A síntese de fitoalexinas antimicrobianas e o fortalecimento da parede celular através da formação de diversos compostos ligados a esta estrutura compõem a resistência dita como inata ou basal das plantas e auxilia na prevenção da infecção de maior parte dos fungos (Lygin et al. 2009).

Todavia, apesar do aumento verificado para fenóis ligados, acredita-se que a quantidade acumulada em função da aplicação dos tratamentos não foi o suficiente para reduzir a severidade da doença. Além disso, *P. pachyrhizi* é conhecido por ser um patógeno bastante agressivo e capaz de infectar e formar os primeiros haustórios entre 24-48 após o contato com o hospedeiro (Goellner et al. 2010). Portanto, existe a possibilidade de que se o monitoramento tivesse persistido por mais tempo, acúmulos maiores pudessem ter sido detectados tanto para fenóis livres quanto para ligados. No entanto, caso este aumento tenha ocorrido em um tempo para além do tempo monitorado, o mesmo não foi suficiente para afetar a severidade da ferrugem-asiática.

Figura 15: Acúmulo de fenóis livres quantificado em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Os tratamentos foram: controle negativo (AGU), controle negativo + *Phakopsora pachyrhizi* (AGU+FAS), taxtomina parcialmente purificada (TPP), taxtomina parcialmente purificada + *Phakopsora pachyrhizi* (TPP+FAS), Acibenzolar-S-metílico (BIO), acibenzolar-S-metílico + *Phakopsora pachyrhizi* (BIO+FAS), fungicidas (FGC) e fungicidas + *Phakopsora pachyrhizi* (FGC+FAS). As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

Figura 16: Acúmulo de fenóis ligados quantificado em folhas de soja coletadas de plantas mantidas em condições de casa de vegetação submetidas a pulverização com diferentes tratamentos e inoculação 72 horas após a pulverização dos tratamentos com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Os tratamentos foram: controle negativo (AGU), controle negativo + *Phakopsora pachyrhizi* (AGU+FAS), taxtomina parcialmente purificada (TPP), taxtomina parcialmente purificada + *Phakopsora pachyrhizi* (TPP+FAS), Acibenzolar-S-metílico (BIO), acibenzolar-S-metílico + *Phakopsora pachyrhizi* (BIO+FAS), fungicidas (FGC) e fungicidas + *Phakopsora pachyrhizi* (FGC+FAS). As barras representam o erro padrão. Na figura B, encontram-se plotados os dados separados do tempo 120 h. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

4.6. Efeito da aplicação de diferentes potenciais indutores de resistência contra *P. pachyrhizi* em soja, em condições de campo

4.6.1. Severidade e produtividade

Em se tratando deste experimento realizado em condições de campo, o único tratamento que diferiu em relação aos demais para a severidade foram os fungicidas (Tabela 5). Tal tratamento foi capaz de manter a severidade inferior aos demais tratamentos durante todo o ciclo de cultivo. Como consequência, quando observada a produtividade, tal fato refletiu e o tratamento com fungicidas foi o que apresentou o maior valor, sendo o único que diferiu em relação aos demais para esta variável. A aplicação de fungicidas como forma de manejo da ferrugem-asiática é a mais utilizada atualmente e seus efeitos na redução da severidade da doença e, conseqüentemente, na manutenção da produtividade já são bem descritos na literatura (Doreto et al. 2012; Dal Pogetto et al. 2012). O principal dano ocasionado pela ferrugem-asiática é a desfolha precoce, a qual impede a formação completa das sementes e afeta a produtividade (Yorinori et al. 2004; Soares et al. 2004). A produtividade também pode ser afetada através da redução da formação de vagens normais, número menor de grãos por vagem e menor peso de grãos (Ribeiro e Costa 2000).

Tabela 5: Severidade da ferrugem-asiática, produtividade e redução da produtividade em plantas de soja em condições de campo como resposta a aplicação dos diferentes tratamentos.

Tratamento	Severidade (%)			Produtividade sc ha ^{-1**}	Redução (%)***
	Avaliação				
	1	2	3		
Controle negativo	50,99 a*	69,96 a*	84,26 a*	42,82 a*	25,11
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces</i> autoclavado	53,94 a	73,05 a	87,17 a	40,96 a	28,37
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces</i> não autoclavado	51,51 a	72,96 a	86,90 a	42,07 a	26,42
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	49,10 a	77,04 a	85,64 a	40,98 a	28,33
Acibenzolar-S-metílico	48,09 a	78,69 a	86,52 a	44,95 a	21,39
Fungicidas	19,54 b	48,05 b	50,02 b	57,18 b	0
C.V. (%)	6,81	7,46	5,90	7,21	-

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$ de significância

**Avaliação realizada 105 dias após a semeadura

***Redução da produtividade calculada em relação ao tratamento com fungicidas.

Quando calculada a redução da produtividade em função do melhor tratamento (fungicidas), foi possível observar que alguns tratamentos foram ineficazes e apresentaram valores inferiores a produtividade do tratamento controle, possivelmente como consequência da maior severidade apresentada (Tabela 5). Entretanto, não houve diferença estatística.

Ao final do experimento, visivelmente o tratamento com fungicidas foi capaz de manter uma maior quantidade de folhas e, consequentemente, proporcionou melhores condições para que a plantas completassem o enchimento de grãos de maneira adequada (Figura 17). Os demais tratamentos apresentaram desfolha elevada. Cabe destacar que níveis de desfolha acima de 50 % reduzem o número de vagens e sementes por planta para cultivares com hábito de crescimento indeterminado e reduzem o peso de 100 sementes para cultivares de hábito de crescimento determinado (Monteiro et al. 2017).

A utilização da taxtomina parcialmente purificada neste experimento de campo foi inviabilizada pelo volume necessário para a aplicação. O volume produzido no momento da realização deste experimento não era capaz de suprir a demanda para aplicação a cada 15 dias. Neste sentido, ajustes na metodologia de produção da taxtomina parcialmente purificada vem

sendo realizados e testados visando a maximização da produção. Alguns ajustes nos requerimentos físicos e químicos de *S. scabies*, como por exemplo, temperatura, oxigenação, fonte de carbono e nitrogênio vem sendo testados e a concentração da taxtomina parcialmente purificada produzida monitorada em função destas modificações. Além disso, a adição de outros componentes ao meio de cultivo também vem sendo estudada, como por exemplo, suberina e celobiose. A celobiose pode estimular a produção de taxtomina, sendo fundamental na expressão dos genes relacionados a biossíntese (Joshi et al. 2007; Johnson et al. 2007; Loria et al. 2008). Portanto, atualmente tais alterações estão sendo testadas buscando-se uma alternativa para que se consiga produzir a taxtomina parcialmente purificada em concentrações e volumes maiores para que possa ser utilizada em ensaios que necessitam de volume maior.

Figura 17: Desfolha de plantas de soja observada em condições de campo 88 dias após a semeadura em resposta a aplicação do controle negativo (A), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavada (B), meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavada (C), filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies* (D); acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$) (E) e fungicidas (F) e a ocorrência de *P. pachyrhizi*.

4.6.2. Teste de retenção em peneiras

No que diz respeito a classificação física das sementes colhidas no experimento de campo através da retenção em peneiras, foi possível constatar que o tratamento fungicida foi capaz de proporcionar sementes maiores (Figura 18). Neste ponto, o tratamento com fungicidas foi o único a ter aproximadamente 50 % das sementes classificadas retidas na peneira número 18 e 25 % retidas na peneira número 16.

Os demais tratamentos aplicados neste experimento apresentaram os maiores picos de retenção distribuídos nas peneiras número 15, 16 e 18. Além disso, como é possível

observar nos dados, todos os tratamentos, exceto fungicidas, tiveram a sua faixa de retenção maior quando utilizadas peneiras de menor diâmetro, como as peneiras número 14, 13 e 12. Isso demonstra que estes tratamentos apresentaram a formação de sementes predominantemente menores se comparados ao tratamento com fungicidas. Ademais, se comparados ao controle, os mesmos seguiram a mesma tendência e não apresentaram diferenças.

O tratamento com fungicidas proporcionou a manutenção da área foliar em melhores condições durante todo o experimento em função da redução da severidade da ferrugem-asiática, como já observados por outros autores (Goulart et al. 2011; Doreto et al. 2012) e tal fato reflete na formação e enchimento de grãos de maneira significativa. Com isso, a proporção de grãos retidos nas peneiras de maiores diâmetros foi superior para o tratamento com fungicidas em relação ao controle e aos demais tratamentos. Portanto, isso reforça a importância da manutenção da área foliar com a utilização de fungicidas durante a ocorrência da ferrugem-asiática, uma vez que estes possibilitam a formação de grãos maiores e mais pesados. Em contrapartida, os demais tratamentos apresentaram a formação de grãos predominantemente menores em relação ao tratamento com fungicidas, permanecendo iguais ao controle, como consequência da alta severidade apresentada ao longo do experimento. Já é sabido que a ocorrência de altas severidades acarreta na desfolha precoce das plantas comprometendo a formação e o enchimento de grãos (Yorinori et al. 2004).

Figura 18: Classificação física de sementes de soja através do teste de retenção em peneiras. Sementes colhidas em experimento realizado em condições de campo, onde as plantas foram submetidas a aplicação de seis tratamentos (controle, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* autoclavado, meio com suspensão de células de *Streptomyces scabies* não autoclavado, filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies*, Acibenzolar-S-metílico e fungicidas) durante o ciclo de cultivo. As sementes foram classificadas de acordo com 10 peneiras de diferentes diâmetros e os dados foram apresentados em porcentagem de retenção por peneira de cada tratamento. As barras representam o erro padrão.

4.6.3. Germinação

O teste de germinação padrão recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foi realizado e não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados (Tabela 6). Apesar da classificação em peneiras ter indicado a formação de grãos maiores para o tratamento com fungicidas, o que poderia ser um indicativo de sementes melhores, tal fato não foi confirmado no presente experimento. Além disso, numericamente, os tratamentos com filtrado do meio de cultivo de *Streptomyces scabies* e Acibenzolar-S-metílico foram inferiores ao tratamento controle.

O tratamento com fungicidas apresentou as sementes de maior tamanho no teste de retenção em peneiras, todavia, isso não refletiu na germinação. Há relatos de que o tamanho das sementes reflete na qualidade fisiológica e, além disso, sementes maiores tendem a apresentar maiores porcentagens de germinação e vigor mais elevado (Pádua et al. 2010).

Tabela 6: Germinação de sementes de soja (expressa em porcentagem de plântulas normais) colhidas de plantas submetidas a aplicação de potenciais indutores de resistência em condições de campo. Colheita realizada 105 dias após a semeadura.

Tratamento	Germinação (%)*
Controle negativo	96 a
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado	96 a
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> não autoclavado	97 a
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	95 a
Acibenzolar-S-metílico	94 a
Fungicida	99 a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

A germinação adequada de sementes e o estabelecimento de plântulas no campo são processos críticos no ciclo de sobrevivência e crescimento das culturas (Ellis e Roberts 1981; Basra et al. 2003). Para a cultura da soja, estes processos determinam a uniformidade e a densidade de plantas no campo (Moshtaghi-Khavaran et al. 2014), que afetam diretamente a produtividade obtida ao final do ciclo (Singh et al. 2009).

Portanto, a utilização de sementes com taxas de germinação elevadas é de suma importância para a obtenção de uma boa população de plantas e, conseqüentemente, altas produtividades. Ademais, a realização de testes de germinação em sementes permite que sejam feitas as correções necessárias para que se obtenha a população final ideal de plantas.

4.6.4. Envelhecimento acelerado

Para a verificação do vigor das sementes colhidas, foi realizado o teste de envelhecimento acelerado. O teste de envelhecimento acelerado em condições ambientais adequadas pode servir como parâmetro para a realização de estimativas precisas de emergência de plântulas de soja em campo (Torres et al. 2004). Para os dados obtidos neste experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 7). Apesar de que apenas o tratamento com fungicidas foi capaz de reduzir a severidade da ferrugem-asiática e apresentar a maior produtividade, bem como sementes majoritariamente maiores, a ineficiência dos demais tratamentos não afetou o vigor das sementes produzidas.

Tabela 7: Germinação de sementes de soja (expressa em porcentagem de plântulas normais) colhidas de experimento em condições de campo e submetidas ao teste de envelhecimento acelerado para a verificação do vigor. Colheita realizada 105 dias após a semeadura.

Tratamento	Germinação (%)*
Controle negativo	95 a
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> autoclavado	95 a
Meio com suspensão de células de <i>Streptomyces scabies</i> não autoclavado	93 a
Filtrado do meio de cultivo de <i>Streptomyces scabies</i>	94 a
Acibenzolar-S-metílico	95 a
Fungicida	93 a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram entre si no teste de Scott-Knott a $p \leq 0,05$.

A mensuração do vigor pelo teste do envelhecimento acelerado baseia-se na hipótese de que a morte de sementes no armazenamento seria consequência da coagulação de proteínas (desnaturação) e que após certos níveis de temperatura ocorre aceleração da deterioração de sementes (Delouche 1965). A exposição de sementes a condições de temperatura e umidade elevadas acelera o processo de deterioração e neste processo sementes com vigor elevado apresentam maior capacidade de produzir plântulas normais (Marcos Filho et al. 2000). O tamanho das sementes tem relação direta com o vigor apresentado, todavia, ao contrário do que Marcos Filho et al. (2000) observou em seu estudo, neste experimento não foram constatadas diferenças entre o tratamento com o tamanho de sementes predominantemente maiores (fungicidas) e os demais tratamentos que apresentaram sementes majoritariamente menores.

A ocorrência de porcentagens reduzidas de plântulas normais para sementes menores baseia-se no fato de que esta classe de sementes atinge a saturação de água em um tempo significativamente inferior ao tempo demandado por sementes maiores e, portanto, sofrem o efeito da temperatura na coagulação de proteínas por um período maior (Marcos Filho et al. 2000). Apesar de que o tamanho de sementes apresenta efeitos sobre o teste de envelhecimento acelerado e que a utilização de amostras com tamanho uniforme pode oferecer informações mais robustas (Marcos Filho et al. 2000), os possíveis efeitos dos diferentes tamanhos de sementes de cada tratamento utilizados neste experimento não foram constatados.

4.7. Obtenção do fator de retenção (R_f) de taxtomina purificada através de cromatografia de camada delgada (TLC)

Em relação a realização deste ensaio de cromatografia de camada delgada (TLC), o fator de retenção da taxtomina purificada foi obtido através da divisão da distância percorrida pela taxtomina purificada e a distância percorrida pelo solvente, onde o solvente percorreu 17,5 cm e a taxtomina purificada percorreu 4,3 cm (Figura 19). Portanto, como resultado da divisão, o fator de retenção (R_f) obtido para a taxtomina purificada foi de 0,25. A obtenção deste valor possibilita a realização de comparação da taxtomina parcialmente purificada produzida através da separação em acetato de etila e que não sofre o processo de purificação total com a taxtomina purificada, a qual é tida como padrão de referência por se tratar da taxtomina A purificada. Sendo assim, é possível fazer uma checagem, por vezes, para verificação da semelhança do composto produzido no laboratório (taxtomina parcialmente purificada) com o composto padrão (taxtomina purificada).

O valor de R_f de 0,25 encontrado neste experimento se assemelha aos valores relatados na literatura para esta fitotoxina. Em estudos realizados em condições similares, Goyer et al. (1998) e Duval et al. (2005) obtiveram valor de R_f de 0,27, sendo muito similar ao R_f obtido neste experimento. Outros autores destacam a fácil identificação de taxtomina A e B em placas de cromatografia de camada delgada através da comparação dos valores de R_f obtidos com padrões (Conn et al. 1998). Além disso, a coloração amarela brilhante e a estabilidade da taxtomina por meses contribui para a identificação através da cromatografia de camada delgada (Conn et al. 1998). Os referidos autores ainda realizaram um teste de fitotoxicidade com a toxina em tubérculos de batata, os quais reproduziram os sintomas e confirmaram que a identificação realizada por cromatografia de camada delgada foi correta (Conn et al. 1998).

Desta forma, fica evidenciada a confiabilidade deste método para a identificação de taxtomina através da comparação dos valores de R_f obtidos com os valores de R_f padrão. O valor do fator de retenção da taxtomina purificada obtido neste experimento será utilizado em experimentos futuros como critério de comparação com a taxtomina parcialmente purificada.

Figura 19: Placa de cromatografia de camada delgada apresentando coeficiente de retenção (R_f) para a taxtomina purificada (TPU) visualizada em luz fluorescente (A) e no comprimento de onda no ultravioleta longo de 365 nm (B). A primeira linha (Início) representa onde a TPU e o controle (MET) foram depositados na placa e última linha (Fim) representa a distância percorrida pelo solvente na placa até a paralisação da corrida. A linha intermediária demonstra a distância percorrida pela TPU no solvente clorofórmio/metanol (9:1).

4.8. Monitoramento da resposta de plantas de soja à aplicação de taxtomina parcialmente purificada e taxtomina purificada através da expressão de genes ligados a resistência

Como observado (Figura 20), ocorreram respostas bastante distintas para os genes monitorados neste experimento. Os genes PR1, NPR1 e MESA foram regulados negativamente pela aplicação de TPP e TPU. O gene ERF1 permaneceu praticamente igual ao controle quando da aplicação de TPU, mas foi regulado negativamente quando da aplicação de TPP. Já o gene Myc2 foi expresso na mesma proporção que o controle, não respondendo a aplicação de taxtomina parcialmente purificada e taxtomina purificada. Todavia, para o gene

ACC verificou-se a regulação positiva em resposta a aplicação de taxtomina parcialmente purificada e taxtomina purificada. Para este gene, a resposta foi superexpressa em 1 vez mais para taxtomina purificada e 2 vezes mais para taxtomina parcialmente purificada.

Figura 20: Alteração na expressão de genes ligados as vias de defesa e monitorados em folhas de plântulas de soja coletadas 24 horas após a aplicação foliar do tratamento controle (AGU), taxtomina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) (TPP) e taxtomina purificada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (TPU) em condições de casa de vegetação. Genes com valores superiores ao controle ($\geq 1,0$) foram considerados como regulados positivamente e genes com valores inferiores foram considerados como regulados negativamente. Genes com valores próximos a 1,0 não foram alterados.

O ACC está relacionado a via do etileno, sendo o precursor deste (Yang 1987) e o etileno está envolvido em várias alterações fisiológicas em plantas, incluindo respostas a estresses (Yang e Hoffman 1984; Wang et al. 2002). Tais alterações podem envolver a modificação da parede celular, acúmulo de açúcares, modificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos, acúmulo de antocianinas e carotenoides (Pereira et al. 2005).

Sabe-se que em *A. thaliana*, fitotoxinas como a ALL-toxina, FB1 e fusicoccina podem induzir morte celular programada, a produção de peróxido de hidrogênio e alterar a expressão de genes relacionados as espécies reativas de oxigênio, ácido salicílico (AS), ácido

jasmônico (AJ) e etileno (ET) (Wang 1996; Roberts e Bowles 1999; Asai et al. 2000; Malerba et al. 2003; Gechev et al. 2004). Assim como estas toxinas, a taxtomina também possui a capacidade de causar morte celular programa em *A. thaliana*, possivelmente em função da inibição da biossíntese de celulose (Duval et al. 2005). Além disso, em estudo realizado, a taxtomina não alterou positivamente a expressão do gene PR1 (Duval et al. 2005), assim como observado neste experimento. Entretanto, esta fitotoxina foi capaz de regular positivamente o gene PAL após 12 horas e manter até o fim do experimento, sugerindo a importância deste caminho no processo de defesa (Duval et al. 2005).

Cabe ainda ser considerada outra hipótese acerca da taxtomina. É relatado que o reconhecimento da planta inicialmente pode ocorrer pela via do jasmonato-etileno e não ocorrer a expressão da via do ácido salicílico, como no caso de plantas infectadas por *P. pachyrhizi* (Campe et al. 2014). Quando plantas de soja entram em contato com este patógeno, expressam inicialmente genes relacionados a via do jasmonato-etileno, incomum para patógenos biotróficos, uma vez que para este grupo, de maneira geral, há ativação da via do ácido salicílico (Campe et al. 2014). A indução de genes relacionados a via do jasmonato/etileno ocorreu 12 h após a infecção de *P. pachyrhizi*, possivelmente em resposta a penetração das células da epiderme pelo apressório do fungo (Barros 2016). Após 24 da infecção, quando há um grande desenvolvimento de hifas, genes marcadores da via do ácido salicílico são induzidos, persistindo por 48 h da infecção e chegando até 192 h. Após esse período, a expressão da via do ácido salicílico retorna ao estado basal e ocorre uma ativação da via do jasmonato (Barros 2016). Além disso, PR1 foi induzido apenas em momentos intermediários (Barros 2016). Com isso, sugere-se que a taxtomina parcialmente purificada possa estar ocasionado alterações em plantas de soja similares as que o fungo *P. pachyrhizi* causa, uma vez que 24 horas após a sua aplicação foi verificada a alteração de genes relacionados a via do etileno. Além disso, existe a possibilidade de após este período de tempo, a via do ácido salicílico ser expressa e permanecer por um determinado período até retornar ao seu estado basal, assim como acontece quando da infecção pelo patógeno. Ademais, é possível que assim como ocorre na infecção por *P. pachyrhizi*, o gene PR1 pode ser regulado positivamente para aplicação de taxtomina parcialmente purificada em soja, todavia, com o monitoramento de apenas um tempo não foi possível realizar esta observação. Assim sendo, outros experimentos com monitoramento destes genes chave no metabolismo por um período de tempo maior e que possam trazer informações mais claras são necessários para a elucidação da ativação das vias de defesa em soja por taxtomina parcialmente purificada. Por hora, as informações obtidas neste experimento não permitem a formação

conclusões mais específicas acerca das vias alterados por taxtamina parcialmente purificada e taxtamina purificada em soja.

5. CONCLUSÕES

A taxtomina parcialmente purificada inibiu total ($200 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) ou parcialmente ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, sendo que seu efeito variou em função da concentração e tempo de exposição.

Em folhas destacadas, taxtomina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o Acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$ p.c.) foram eficientes em reduzir a severidade da ferrugem-asiática da soja.

Apenas o tratamento com o fungicida picoxistrobina+benzovindiflupir ($3,33 \text{ mL L}^{-1}$ p.c.) reduziu a severidade da ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação.

A aplicação de taxtomina parcialmente purificada combinada com a inoculação de *Phakopsora pachyrhizi* aumentou a atividade de guaiacol peroxidase e o acúmulo de fenóis ligados.

Em condições de campo, apenas o tratamento com programas com fungicidas foi eficiente na redução da severidade da ferrugem-asiática, apresentando a maior produtividade e a formação de sementes predominantemente maiores em relação aos demais tratamentos. Todavia, nenhum dos tratamentos aplicados interferiu na germinação e vigor das sementes colhidas.

A cromatografia de camada delgada possibilitou a obtenção do fator de retenção ($R_f = 0,25$) para a taxtomina purificada.

O monitoramento gênico possibilitou a verificação da regulação positiva do gene ACC, relacionado a síntese do etileno, em resposta a aplicação de taxtomina parcialmente purificada e taxtomina purificada.

REFERÊNCIAS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology, 5th edn. Elsevier: Academic Press, San Diego
- Asai T, Stone JM, Heard JE, et al (2000) Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12:1823–36
- Azevedo LAS de, Juliatti FC, Barreto M (2007) Resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. *Summa Phytopathol* 33:252–257. doi: 10.1590/S0100-54052007000300007
- Babcock MJ, Eckwall EC, Schottel JL (1993) Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J Gen Microbiol* 139:1579–1586. doi: 10.1099/00221287-139-7-1579
- Ballester A-R, Lafuente MT, de Vos RCH, et al (2013) Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem* 136:178–185. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.114
- Balmer A, Pastor V, Gamir J, et al (2015) The ‘prime-ome’: towards a holistic approach to priming. *Trends Plant Sci* 20:443–452. doi: 10.1016/j.tplants.2015.04.002
- Barros VA (2016) Vias de sinalização mediadas por ácido salicílico e metil-jasmonato e papel de GmbZIP89 em resposta a infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos contrastantes de soja. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa
- Basra SMA, Ahmad N, Khan MM, et al (2003) Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. *Seed Sci Technol* 31:531–540
- Bate NJ, Orr J, Ni W, et al (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7608–12
- Beauséjour J, Goyer C, Vachon J, Beaulieu C (1999) Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can J Microbiol* 45:764–768. doi: 10.1139/w99-072
- Berestetskiy AO (2008) A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Appl Biochem Microbiol* 44:453–465. doi: 10.1134/S0003683808050013
- Bergamin Filho A, Amorim L, Rezende JAM (2018a) Importância das doenças de plantas. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pg 15–24
- Bergamin Filho A, Amorim L, Willocquet L, Savary S (2018b) Epidemiologia de doenças de plantas. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pg 71–83
- Bonaldo SM, Pascholati SF, Romeiro RS (2005) Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, et al. (eds) *Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos.*, 1st edn. Fealq, Piracicaba, pg 11–28
- Bonde MR, Melching JS, Bromfield KR (1976) Histology on the suspect-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 66:1290–1294
- Borges DI, Alves E, Moraes MB d., Oliveira DF (2013) Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. *Rev Bras Plantas Med* 15:325–331. doi: 10.1590/S1516-05722013000300003

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brand SC (2016) *Taxtomina A e Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo
- Brasil (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao>. Acessado 5 Out 2018
- Brasil (2009a) Teste de uniformidade (retenção em peneira). In: Regras para a Análise de Sementes, 1st edn. Mapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, pg 351–352
- Brasil (2009b) Teste de germinação. In: Regras para a Análise de Sementes, 1st edn. Mapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, pg 147–224
- Brasil A (2011) Brasil assumirá liderança na produção mundial de soja, prevê Ministério da Agricultura. Brasília
- Bray HG, Thorpe W V (1954) Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Methods Biochem Anal* 1:27–52
- Bromfield KR (1984) Soybean rust. American Phytopathological Society, St. Paul: MN
- Busso C, Mazaro SM (2015) Utilization of colloidal chitin stained with remazol brilliant blue R as a sensitive, rapid and economical alternative to detect chitinase in plants. In: 23 Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology/44 Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, pg 239
- Calvo ÉS, Kiihl RAS, Garcia A, et al (2008) Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. *Crop Sci* 48:1350. doi: 10.2135/cropsci2007.10.0589
- Campe R, Loehrer M, Conrath U, Goellner K (2014) *Phakopsora pachyrhizi* induces defense marker genes to necrotrophs in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol* 87:1–8. doi: 10.1016/j.pmpp.2014.04.005
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (2001) Fungal cells and vegetative growth. In: Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (eds) *The Fungi*, 2nd edn. Academic Press, London, pg 85–184
- Cavalcanti FR, Resende ML V., Zacaroni AB, et al (2006) Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatol Bras* 31:372–380. doi: 10.1590/S0100-41582006000400007
- Cavalcanti LS, Brunelli KR, Stangarlin JR (2005a) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti LS, Piero RM Di, Cia P, et al. (eds) *Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos*, 1st edn. Fealq, Piracicaba, pg 81–124
- Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, et al (2005b) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. 1st edn. Fealq, Piracicaba
- Clarke JD, Volko SM, Ledford H, et al (2000) Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:2175–90
- Conab CN de A (2017) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Sétimo levantamento, monitoramento agrícola - safra 2016/17. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília
- Conab CN de A (2018) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Primeiro levantamento, monitoramento agrícola – safra 2018/19. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília

- Conn KL, Leci E, Kritzman G, Lazarovits G (1998) A Quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab-inducing strains. *Plant Dis* 82:631–638. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.6.631
- Cruz MFA da, Rodrigues FÁ, Polanco LR, et al (2013) Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction. *Bragantia* 72:162–172. doi: 10.1590/S0006-87052013005000025
- Dal Pogetto MHF do A, Raetano CG, Christovam R de S, et al (2012) Controle da ferrugem asiática e produtividade da soja após pulverizações de piraclostrobina + epoxiconazole em diferentes estádios fenológicos da cultura. *Summa Phytopathol* 38:248–250. doi: 10.1590/S0100-54052012000300013
- Dalio RJD, Máximo HJ, Oliveira TS, et al (2018) Molecular Basis of Citrus sunki Susceptibility and Poncirus trifoliata Resistance Upon *Phytophthora parasitica* Attack. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:386–398. doi: 10.1094/MPMI-05-17-0112-FI
- Dallagnol LJ, Navarini L, Ugalde MG, et al (2006) Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathol* 32:255–259. doi: 10.1590/S0100-54052006000300007
- Delouche JC (1965) An accelerated aging technique for predicting the relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. *Agron Abstr* 40
- Di Piero RM (2003) Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo
- Doreto RBS, Gavassoni WL, Silva EF da, et al (2012) Ferrugem asiática e produtividade da soja sob doses de potássio e fungicida, na safra 2007/08. *Semin Ciências Agrárias* 33:941–952. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p941
- Doubrava NS, Dean RA, Kuć J (1988) Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* 33:69–79. doi: 10.1016/0885-5765(88)90044-6
- Duarte H da SS, Zambolim L, Rodrigues F de Á, et al (2009) Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. *Ciência Rural* 39:2271–2277. doi: 10.1590/S0103-84782009000800001
- Duval I, Brochu V, Simard M, et al (2005) Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* 222:820–831. doi: 10.1007/s00425-005-0016-z
- Egea C, Ahmed AS, Candela M, Candela ME (2001) Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* 158:151–158. doi: 10.1078/0176-1617-00079
- Ellis RH, Roberts EH (1981) The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci Technol* 2:373–409
- Embrapa (2018) Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Sistema de alerta. <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/>. Accessed 8 Oct 2018
- Embrapa (2000) Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 2000/01. Documentos, 146. EMBRAPA/CNPSo, Londrina, pg 245

- Errakhi R, Dauphin A, Meimoun P, et al (2008) An early Ca^{2+} influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. J Exp Bot 59:4259–4270. doi: 10.1093/jxb/ern267
- Fao (2013) FAO Statistical yearbok 2013, 1st edn. FAO
- Fao (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/en/>. Accessed 5 Set 2018
- Fao, Ifad, Wfp (2014) The state of food insecurity in the world 2014. In: Strengthening the enabling environment food security and nutrition. <http://www.fao.org/publications/sofi/2014/en/>. Acessado 21 Out 2018
- Fellows H (1926) Relation of growth in the potato tuber to the potato scab disease. J Agric Res 32:757–781
- Fiallos RFG (2011) A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. Cienc y Tecnol 4:45–60
- Fiesp (2016) Outlook Fiesp 2026: projeções para o agronegócio brasileiro, 1st edn. FIESP, São Paulo
- Fliegmann J, Schüller G, Boland W, et al (2003) The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. Biol Chem 384:437–446. doi: 10.1515/BC.2003.049
- Franceschi VT, Mazaro SM, Duarte HSS, Godoy C V. (2017) Development and validation of a new standard area diagram set to estimate severity of soybean rust. In: 50 Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumos do 50 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia
- Friend J (1981) Plant phenolics, lignification and plant disease. In: Reinhold L, Harborne JB, Swain T (eds) Progress in Phytochemistry, 7th edn. Pergamon, Oxford, pg 197–261
- Furtado GQ, Moraes SRG, Alves SAM, et al (2011) The infection of soybean leaves by *Phakopsora pachyrhizi* during conditions of discontinuous wetness. J Phytopathol 159:165–170. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01742.x
- Garcés FR, Reis EM, Deuner E, et al (2010a) Severidad de *Phakopsora pachyrhizi* en el cultivo de soya en condiciones de invernadero. Trop Plant Pathol 35:Supl. S-163
- Garcés FR, Reis ME, Cardoso CDA, Forcelini CA (2010b) Umbral numérico de infección de *Phakopsora pachyrhizi* en el cultivo de soya. Trop Plant Pathol 35:Supl. S-168
- Garcia EO (2008) Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo
- Garcia EO, Biazotto FO, Pascholati SF (2008a) Taxtomina A: efeito protetor em plantas de pepino contra antracnose. In: 31 Congresso Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopatologica 34:56-56
- Garcia EO, Fischer IH, Macagnan D., et al (2007a) Resistência de cultivares de batata a isolados de *Streptomyces* com diferentes níveis de produção de taxtomina A. In: 30 Congresso Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopatologica 33:56-56
- Garcia EO, Pascholati SF (2008) Efeitos ultraestruturais e bioquímicos da taxtomina A em sorgo. In: 31 Congresso Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopatologica 34:55-56
- Garcia EO, Pascholati SF, Almeida M (2007b) Potencial eliciador de fitoalexinas e mecanismos de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo. In: 40 Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatol Bras 32:246-246
- Garcia EO, Pascholati SF, Casela CR, Fialho MB (2008b) Fitotoxina taxtomina A (*Streptomyces* spp): efeito *in vitro* e indução de resistência em plantas de sorgo contra *Colletotrichum sublineolum*. In: 41 Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Trop Plant Pathol. 33:191-191

- Garcia EO, Pascholati SF, Macagnan D, Fischer IH (2007c) Reação de cultivares de batata a fitotoxina Taxtomina A. In: 30 Congresso Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopatologica 33:56-56
- Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. Cell Mol Life Sci 61:1185–1197. doi: 10.1007/s00018-004-4067-2
- Gerber IB, Zeidler D, Durner J, Dubery IA (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. Planta 218:647–657. doi: 10.1007/s00425-003-1142-0
- Glazebrook J (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. Curr Opin Plant Biol 4:301–8
- Godoy C, M Utiamada C, Meyer M, et al (2018) Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular técnica, 138. Londrina
- Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, et al (2016a) Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. Pesqui Agropecuária Bras 51:407–421. doi: 10.1590/S0100-204X2016000500002
- Godoy C V., Almeida AMR, Costamilan LM, et al (2016b) Doenças da soja. In: Amorin L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (eds) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pg 772
- Godoy C V., Pimenta CB, Miguel-Wruck DS, et al (2007) Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07. Resultados sumarizados dos ensaios em rede. Circular técnica, 42. Londrina
- Godoy C V, Canteri MG (2004) Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. Fitopatol Bras 29:97–101. doi: 10.1590/S0100-41582004000100016
- Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. Eur J Plant Pathol 121:233–242. doi: 10.1007/s10658-007-9251-4
- Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, et al (2010) *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. Mol Plant Pathol 11:169–177. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x
- Goulart ACP, Furlan SH, Fujino MT (2011) Controle integrado da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) com o fungicida fluquinconazole aplicado nas sementes em associação com outros fungicidas pulverizados na parte aérea da cultura. Summa Phytopathol 37:113–118. doi: 10.1590/S0100-54052011000200005
- Goyer C, Vachon J, Beaulieu C (1998) Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. Phytopathology 88:442–445. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.5.442
- Guzzo SD (2003) Proteínas relacionadas à patogênese. Revisão Anual Patol Plantas 11:283–332
- Guzzo SD, Castro RM, Kida K, Martins EMF (2001) Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. Arq Inst Biol (Sao Paulo) 68:89–94
- Hallmann J, Sikora RA (1996) Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. Eur J Plant Pathol 102:155–162. doi: 10.1007/BF01877102

- Hammerschmidt D, Dann EK (1997) Induced resistance to disease. In: Rechcigl NA, Rechcigl JE (eds) *Environmentally safe approaches to crop disease control*, 1st edn. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, pg 177–179
- Hammerschmidt R (2007) Introduction: definitions and some history. In: Walters D, Newton A, Lyon G (eds) *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*, 1st edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pg 269
- Henning AA, Almeida AMR, Godoy C V., et al (2010) *Manual de identificação de doenças de soja*, 4th edn. Embrapa Soja, Londrina
- Henning AA, Godoy C V. (2006) Situação da ferrugem da soja no Brasil e no munda. In: Zambolin L (ed) *Ferrugem Asiática da Soja*. Editora UFV, Viçosa, pg 1–14
- Herms S (2002) A Strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against *Tobacco Mosaic Virus* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Physiol* 130:120–127. doi: 10.1104/pp.004432
- Hirakuri MH, Lazzarotto JJ (2014) *O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro*. Documentos, 349. Londrina
- Hoagland RE (1990) Biochemical responses of plants to pathogens. In: Hoagland RE (ed) *Microbes and microbial products as herbicides*. American Chemical Society, Washington, pp 87–113
- Hsu CM, Wu LC (1968) Study on soybean rust. *Sci Agric* 6:86–88
- Joglekar S, Suliman M, Bartsch M, et al (2018) Chemical activation of EDS1/PAD4 signaling leading to pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 59:1592–1607. doi: 10.1093/pcp/pcy106
- Johnson EG, Joshi M V., Gibson DM, Loria R (2007) Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiol Mol Plant Pathol* 71:18–25. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.09.003
- Joshi M, Rong X, Moll S, et al (2007) *Streptomyces turgidiscabies* Secretes a Novel Virulence Protein, Nec1, Which Facilitates Infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:599–608. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0599
- Katz VA, Thulke OU, Conrath U (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* 117:1333–9
- Keel C, Wirthner PH, Oberhansli TH, et al (1990) *Pseudomonads* as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327–342
- Kiba A, Tomiyama H, Takahashi H, et al (2003) Induction of resistance and expression of defense-related genes in tobacco leaves infiltrated with *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Physiol* 44:287–95
- King RR, Lawrence CH (1996) Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. *J Agric Food Chem* 44:1108–1110. doi: 10.1021/jf950243o
- King RR, Lawrence CH, Calhoun LA (1992) Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *J Agric Food Chem* 40:834–837. doi: 10.1021/jf00017a025
- King RR, Lawrence CH, Clark MC (1991) Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *Am Potato J* 68:675–680. doi: 10.1007/BF02853743
- King RR, Lawrence CH, Clark MC, Calhoun LA (1989) Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J Chem Soc Chem Commun* 13:849. doi: 10.1039/c39890000849

- King RR, Lawrence CH, Gray JA (2001) Herbicidal properties of the thaxtomin group of phytotoxins. *J Agric Food Chem* 49:2298–2301. doi: 10.1021/jf0012998
- Koch E, Ebrahimnesbat HH, Hoppe F (1983) Light and electron- microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathol Zeitschrift* 106:302–320
- Koch E, Hoppe HH (1987) Effect of light on uredospore germination and germ tube growth of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *J Phytopathol* 119:64–74. doi: 10.1111/j.1439-0434.1987.tb04384.x
- Kofalvi SA, Nassuth A (1995) Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* 47:365–377. doi: 10.1006/pmpp.1995.1065
- Koga LJ, Canteri MG, Calvo ÉS, et al (2008) Análise multivariada dos componentes da resistência à ferrugem asiática em genótipos de soja. *Pesqui Agropecuária Bras* 43:1277–1286. doi: 10.1590/S0100-204X2008001000004
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 128:1046–1056. doi: 10.1104/pp.010744
- Kombrink E, Hahlbrock K (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol* 81:216–221. doi: 10.1104/pp.81.1.216
- Kurusu T, Yagala T, Miyao A, et al (2005) Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J* 42:798–809. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02415.x
- Lazzarotto JJ, Hirakuri MH (2010) Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. *Documentos*, 319. Londrina
- Leiner R (1996) Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* 86:709. doi: 10.1094/Phyto-86-709
- Lerat S, Babana AH, El Oirdi M, et al (2009) *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 28:1895–1903. doi: 10.1007/s00299-009-0792-1
- Liu H, Carvalhais LC, Kazan K, Schenk PM (2016) Development of marker genes for jasmonic acid signaling in shoots and roots of wheat. *Plant Signal Behav* 11:e1176654. doi: 10.1080/15592324.2016.1176654
- Liu J, Tian S, Meng X, Xu Y (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 44:300–306. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.12.019
- Loria R (1995) Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in vitro*. *Phytopathology* 85:537. doi: 10.1094/Phyto-85-537
- Loria R, Bignell DRD, Moll S, et al (2008) Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:3–10. doi: 10.1007/s10482-008-9240-4
- Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis* 81:836–846. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.8.836

- Loria R, Kers J, Joshi M (2006) Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu Rev Phytopathol* 44:469–487. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147
- Lusso MFG, Pascholati SF (1999) Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathol.* 25:244–249
- Lygin A V., Li S, Vittal R, et al (2009) The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 99:1412–1420. doi: 10.1094/PHYTO-99-12-1412
- Malerba M, Cerana R, Crosti P (2003) Fusicoccin induces in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma* 222:113–116. doi: 10.1007/s00709-003-0023-5
- Mapa (2014) Instrução Normativa N° 5, de 14 de março de 2014. Brasília
- Marchetti MA, Melching JS, Bromfield KR (1976) The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 66:461–463
- Marcos Filho J (1999) Teste de envelhecimento acelerado. In: Kryzanovsky FC, Vieira RD., França Neto J de B (eds) *Vigor de sementes: conceitos e testes*, 1st edn. Abrates, Londrina, pg 3.1-3.24
- Marcos Filho J, Novembre ADC, Chamma HMCP (2000) Tamanho da semente e o teste de envelhecimento acelerado para soja. *Sci Agric* 57:473–482
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu Rev Plant Biol* 68:485–512. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132
- Medice R, Alves E, Assis RT de, et al (2007) Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia* 31:83–90. doi: 10.1590/S1413-70542007000100013
- Meneghetti RC, Balardin RS, Corte GD, et al (2010) Avaliação da ativação de defesa em soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas. *Ciência e Agrotecnologia* 34:823–829. doi: 10.1590/S1413-70542010000400005
- Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr Opin Plant Biol* 12:390–398. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.004
- Monteiro MA, Koch F, Nobre FL de L, et al (2017) Intensidade de desfolha e desempenho de plantas de soja com diferentes hábitos de crescimento. *Sci Agrar Parana* 16:265–269
- Moreira EN (2009) Ferrugem asiática da soja: influência do estágio fenológico na ocorrência e comparação de sistemas de aviso. Dissertação de mestrado. Universidade de Passo Fundo
- Mortel M van de, Recknor JC, Graham MA, et al (2007) Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:887–899. doi: 10.1094/MPMI-20-8-0887
- Moshtaghi-Khavarani A, Khomari S, Zare N (2014) Soybean seed germination and seedling growth in response to deterioration and priming: effect of seed size. *Plant Breed Seed Sci* 70:55–67. doi: 10.1515/plass-2015-0013
- Nicholson RL (1995) Events in resistance expression in maize and sorghum: molecular and biochemical perspectives. *Summa Phytopathol* 21:95–99
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30:369–389. doi: 10.1146/annurev.py.30.090192.002101
- Nojosa GBA, Resende MLV, Barguil BM, et al (2009) Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. *Summa Phytopathol* 35:60–62. doi: 10.1590/S0100-54052009000100011

- Oliveira GM, Pereira DD, Camargo LCM, Saab OJGA (2015) Fosfito e silicato de potássio no controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd). Rev Bras Ciências Agrárias - Brazilian J Agric Sci 10:60–65. doi: 10.5039/agraria.v10i1a4771
- ONU (2017) The impact of population momentum on future population growth. Population facts 2017/4. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/PopFacts_2017-4_Population-Momentum.pdf. Acessado 8 Nov 2018
- Osswald WF, Stangarlin JR, Nicholson RL, et al (2004) The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. Summa Phytopathol 30:415–420
- Pádua GP, Zito RK, Arantes NE, França Neto JB (2010) Influência do tamanho da semente na qualidade fisiológica e na produtividade da cultura da soja. Rev Bras Sementes 32:9–16
- Paes SA (2015) Variabilidade fisiológica e molecular de isolados de *Phakopsora pachyrhizi*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa
- Pascholati SF, Dalio RJD (2018a) Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pp 424–450
- Pascholati SF, Dalio RJD (2018b) Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pp 389–419
- Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P (2008) Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Fealq, Piracicaba, pg 627
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep 24:255–265. doi: 10.1007/s00299-005-0972-6
- Pereira LFP, Galvão RM, Kobayashi AK, et al (2005) Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. Brazilian J Plant Physiol 17:283–289. doi: 10.1590/S1677-04202005000300002
- Pereira RB, Alves E, Ribeiro Júnior PM, et al (2008) Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. Pesqui Agropecuária Bras 43:1287–1296. doi: 10.1590/S0100-204X2008001000005
- Pereira SC, Rodrigues FA, Carré-Missio V, et al (2009a) Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. Trop Plant Pathol 34:. doi: 10.1590/S1982-56762009000300005
- Pereira SC, Rodrigues FA, Carré-Missio V, et al (2009b) Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. Trop Plant Pathol 34:223–230. doi: 10.1590/S1982-56762009000400004
- Piccinin E, Di Piero RM, Pascholati SF (2005) Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. Fitopatol Bras 30:5–9. doi: 10.1590/S0100-41582005000100001

- Pinto LR (2014) Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em uva. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo
- Reimann C, Ringli C, Dudler R (1992) Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. *Plant Physiol* 100:1611–1612. doi: 10.1104/pp.100.3.1611
- Reis EM, Bresolin ACR, Carmona R (2006) Doenças da soja I: Ferrugem asiática, 1st edn. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo
- Resende MLV de, Barretti PB, Medeiros FCL de, et al (2006) Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra fitopatógenos. *Revisão Anu Patol Plantas* 14:129–198
- Ribeiro AL de P, Costa EC (2000) Desfolhamento em estádios de desenvolvimento da soja, cultivar BR 16, no rendimento de grãos. *Ciência Rural* 30:767–771. doi: 10.1590/S0103-84782000000500004
- Robert-Seilanianz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49:317–343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447
- Roberts MR, Bowles DJ (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol* 119:1243–1250. doi: 10.1104/pp.119.4.1243
- Rodrigues AAC, Bezerra Neto E, Coelho RSB (2006) Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatol Bras* 31:492–499. doi: 10.1590/S0100-41582006000500009
- Rodrigues FÁ, Jurick WM, Datnoff LE, et al (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* 66:144–159. doi: 10.1016/j.pmpp.2005.06.002
- Romeiro RS (2008) Indução de resistência em plantas a patógenos. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin J., Cia P (eds) *Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*, 1st edn. Fealq, Piracicaba, pg 627
- Rupe J, Sconyers L (2008) Asian soybean rust. *The Plant Heal Instr*. doi: 10.1094/PHI-I-2008-1015-01
- Saath KC de O, Fachinello AL (2018) Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. *Rev Econ e Sociol Rural* 56:195–212. doi: 10.1590/1234-56781806-94790560201
- Saksirirat W, Hoppe HH (1990) *Verticillium psalliotae*, an effective mycoparasite of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *J Plant Dis Prot* 97:622–633
- Santos RF, Blume E, Junges E, Rego MCNF (2013) Atividade antifúngica de produtos alternativos sobre *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella chlamydospora*. *Enciclopédia Biosf* 9:3724
- Saravanan T, Bhaskaran R, Muthusamy M (2004) *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium wilt* disease. *Plant Pathol J* 3:72–80. doi: 10.3923/ppj.2004.72.80
- Schneider KT, van de Mortel M, Bancroft TJ, et al (2011) Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. *Plant Physiol* 157:355–371. doi: 10.1104/pp.111.181149
- Schneider RW, Hollier CA, Whitam HK, et al (2005) First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Dis* 89:774–774. doi: 10.1094/PD-89-0774A

- Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Pascholati SF (2008) Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P (eds) Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular, 1st edn. Fealq, Piracicaba, pg 227–248
- Schweizer P, Buchala A, Metraux JP (1997) Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-Dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol* 115:61–70
- Sediyama T, Silva F, Borém A (2015) Soja: do plantio à colheita, 1st edn. Editora UFV, Viçosa
- Sharma SK, Gupta GK (2006) Current status of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) - A review. 27:91–102
- Shores M, Yedidia I, Chet I (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95:76–84. doi: 10.1094/PHTO-95-0076
- Silva GJS, Behlau F (2018) Controle químico. In: Amorin L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pg 239–260
- Silveira JMFJ da, Borges I de C, Buainain AM (2005) Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. *São Paulo em Perspect* 19:101–114. doi: 10.1590/S0102-88392005000200009
- Singh NI, Ali S, Chauhan JS (2009) Effect of seed size on quality within seed lot of pea and correlation of standard germination, vigour with field emergence test. *Nat Sci* 7:72–78
- Singh RJ, Nelson RL, Chung G. (2007) Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). In: Singh RJ (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: oilseed crops, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, pg 13–49
- Soares ACF, Perez JO, Souza CS, et al (2008) Efeito de acibenzolar-s-metil na proteção de plantas de inhame à *Curvularia eragrostides*. *Rev Caatinga* 21:147–151
- Soares RM, Rubin SDAL, Wielewicz AP, Ozelame JG (2004) Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. *Ciência Rural* 34:1245–1247. doi: 10.1590/S0103-84782004000400045
- Sudhamoy M (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African J Biotechnol* 9:8038–8047. doi: 10.5897/AJB10.984
- Sun C, Shao Y, Vahabi K, et al (2014) The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses. *BMC Plant Biol* 14:268. doi: 10.1186/s12870-014-0268-5
- Tegg RS, Melian L, Wilson CR, Shabala S (2005) Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cell Physiol* 46:638–648. doi: 10.1093/pcp/pci069
- Toal, J (1999) Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. *Plant Pathol* 48:759–767. doi: 10.1046/j.1365-3059.1999.00404.x
- Tokunaga Y, Keon JPR, Hargreaves JA (1998) Benzothiadiazole-activated defence gene expression and disease resistance in barley. In: Lyr H, Russel PE, H.-W.; D, Sisler HD (eds) Modern fungicides and antifungal compounds II: 12th International Reinhardtbrunn Symposium. Intercept, Friedrichroda, Thuringia, Germany, pg 403–409
- Torres RM, Vieira RD, Panobianco M (2004) Accelerated aging and seedling field emergence in soybean. *Sci Agric* 61:476–480

- Tremblay A (2011) Soybean rust: five years of research. In: Sudaric A (ed) Soybean - Molecular Aspects of Breeding. InTech, pp 293–334
- Tsukahara RY, Hikishima M, Canteri MG (2008) Relações entre o clima e o progresso da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em duas micro-regiões do Estado do Paraná. Semin Ciências Agrárias 29:47. doi: 10.5433/1679-0359.2008v29n1p47
- van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, et al (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci 103:5602–5607. doi: 10.1073/pnas.0510213103
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol 44:135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- van Verk MC, Bol JF, Linthorst HJ (2011) Prospecting for genes involved in transcriptional regulation of plant defenses, a bioinformatics approach. BMC Plant Biol 11:88. doi: 10.1186/1471-2229-11-88
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. Annu Rev Phytopathol 18:259–288. doi: 10.1146/annurev.py.18.090180.001355
- Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. BMC Plant Biol 16:86. doi: 10.1186/s12870-016-0771-y
- Wang H (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. Plant Cell Online 8:375–391. doi: 10.1105/tpc.8.3.375
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell 14 Suppl:S131-51
- Wen L, Bowen CR, Hartman GL (2017) Prediction of short-distance aerial movement of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores using machine learning. Phytopathology PHYTO-04-17-013. doi: 10.1094/PHYTO-04-17-0138-FI
- Willians ST, Vickens JC (1988) Detection of actinomycetes in the natural environment - problems and perspectives. In: Okani Y, Bepper T, Ogawara H (eds) Biology of the Actinomycetes 88, 1st edn. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pg 265–270
- Yang S (1987) Regulation of biosynthesis and action of ethylene. Acta Hort 53–60. doi: 10.17660/ActaHortic.1987.201.6
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 35:155–189. doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.001103
- Yang XB (1990) Analysis and quantification of soybean rust epidemics from seventy-three sequential planting experiments. Phytopathology 80:1421. doi: 10.1094/Phyto-80-1421
- Yarborough GG, Taylor DP, Rowlands RT, et al (1993) Screening microbial metabolites for new drugs: theoretical and practical issues. J Antibiot (Tokyo) 46:535–44
- Yeh CC (1981) Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. Phytopathology 71:1111. doi: 10.1094/Phyto-71-1111
- Yorinori JT, Nunes Junior J, Lazzarotto JJ (2004) Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Documentos, 247. Londrina
- Yorinori JT, Paiva WM, Costamilan LM, Bertagnolli PF (2003) Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): identificação e controle. Informações agronômicas, 104. Londrina
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, et al (2005) Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Dis 89:675–677. doi: 10.1094/PD-89-0675

- Yorinori JT, Yuyama MM, Siqueri F V. (2010) Doenças da soja. In: Hiromoto DM, Caju J, Camacho SA (eds) Boletim de pesquisa de soja 2010, 14th edn. Fundação MT, Rondonópolis, pg 218–275
- Yusnawan E, Nugrahaeni N, Utomo JS (2018) Changes of phenolic contents and antioxidant activity in soybean seeds harvested from *Phakopsora pachyrhizi* infected crops. Biosaintifika J Biol Biol Educ 10:369–378. doi: 10.15294/biosaintifika.v10i2.14481
- Zambenedetti EB, Alves E, Pozza EA, et al (2007) Avaliação de parâmetros monocíclicos e da intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em diferentes genótipos de soja e posições de copa. Summa Phytopathol 33:178–181. doi: 10.1590/S0100-54052007000200012

APÊNDICES

APÊNDICE A. Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976)

APÊNDICE B. Curva padrão para a dosagem de fenóis livres e ligados preparada com ácido clorogênico (Bray & Thorpe 1954)