



TÁSSIA BOENO OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO JASMONATO DE METILA E
DO *TWEEN* 20 NA FISIOLOGIA E NA
SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA NA
SOJA**

LAVRAS - MG

2014

TÁSSIA BOENO OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO JASMONATO DE METILA E DO *TWEEN 20* NA
FISIOLOGIA E NA SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA NA
SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Coorientadora

Dra. Clara Beatriz Hoffmann Campo

LAVRAS-MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Tássia Boeno de.

Influência do jasmonato de metila e do *tween* 20 na fisiologia e na severidade da ferrugem asiática na soja / Tássia Boeno de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2014.

90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Jasmonato. 3. Indução de resistência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.322041

TÁSSIA BOENO OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO JASMONATO DE METILA E DO *TWEEN 20* NA
FISIOLOGIA E NA SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA NA
SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2014.

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

UFLA

Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

IFMG/BambuÍ

Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Orientador

LAVRAS-MG

2014

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, amigo fiel e fortaleza, por fazer infinitamente mais do que pedi ou pensei, estando sempre presente e cuidando de cada detalhe. Tudo o que eu vier a ser vem de Ti Senhor.

Aos meus pais, que me ensinaram o caminho que devo andar e o fizeram possível, sendo minha inspiração e força, meu amor incondicional.

À incrível Mayara Souza Gois pela amizade e ajuda durante todo experimento.

Ao meu irmão Lucas, que com sua inteligência e simplicidade sempre me inspirou.

Aos meus tios e tias que cuidam de mim mesmo de longe.

Aos meus primos e amigos que são mais que irmãos, por estarem sempre perto.

Ao meu Amor, por tanta paciência, cuidado e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UFLA, área de concentração em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, por ter disponibilizado toda estrutura para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pela orientação, amizade e compreensão fundamentais durante o meu trabalho e crescimento.

À Clara Beatriz Hoffmann-Campo, pela orientação e confiança depositadas em mim. Por proporcionar todas as condições necessárias para realização do meu projeto de pesquisa. A você, minha admiração e gratidão.

À Sara Dousseau, mais que amiga nos tornamos uma família! Por sua orientação neste trabalho e na vida, por me fazer apaixonar pela fisiologia

vegetal, por me atender nos meus momentos de desespero. Suas palavras me fazem forte, você é um presente de Deus.

À amiga Larissa Moraes, por estar ao meu lado e carregar junto comigo a dificuldade em trabalhar com enzimas. Seu exemplo de ser humano e dedicação ao trabalho vão sempre me inspirar.

À Maria Cristina Neves de Oliveira e à equipe do laboratório de biometria, Tânia e Gilson, pelas análises e ensinamentos estatísticos, com tanta dedicação e paciência.

À Célia Paula dos Santos pela amizade e conhecimento passado desde a graduação, despertando em mim o interesse pela pesquisa.

Ao Dr. Luiz Paulo de Carvalho e família, pela preciosa amizade e conversas produtivas.

À professora Ângela Maria Soares, por seu apoio, incentivo e amizade, fundamentais para a minha formação acadêmica e crescimento pessoal.

Aos professores: José Donizeti Alves, Eduardo Alves, Evaristo Mauro de Castro e Renato Mendes pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores Claudia Vieira Godoy, José Marcos Gontijo Mandarino, Marco Antônio Nogueira e Mariângela Hungria da Cunha, pela confiança em deixar usar seus laboratórios.

Ao pesquisador José Renato Bouças Farias por sua contribuição no planejamento do experimento.

Ao pesquisador Samuel Roggia por ceder sua casa de vegetação.

Ao pesquisador Adonis Moreira pelos ensinamentos e amizade.

Ao pesquisador José Ubirajara Vieira Moreira pela sugestão das cultivares.

A Rodrigo Santos Leite, Mariana Closs Salvador e Leonardo Cesar Ferreira pelo interesse em aprender e disponibilidade em ensinar.

À família do laboratório de Ecologia Química: Mayara, Neiva, Mariana, Pamela, José, Norberto, Marcos, Tati, João, Moises, Giovanni, Adriano e Janaína que tanto me ajudaram nos meus experimentos e foram amigos diariamente. Serei sempre grata e guardarei o que aprendi com vocês por toda minha vida.

À equipe do laboratório de Fitopatologia, em especial ao Allan, Ângelo, Diego e Guilherme pela amizade e ajuda essenciais para realização do meu trabalho. Saibam que vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À equipe do laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Claudinei, Bianca, Walkyria, Fábio, Claudio, Taynara, Bianco, Daniela e Luís Guilherme, pelo auxílio nas avaliações de trocas gasosas.

Aos amigos do laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de plantas: Sara, Jean, Mariana, Amanda, Túlio, Ingrid, Lara e Ana Clara, pelo apoio e torcida.

Aos amigos: Lucas, João Paulo, Jeffinho, Jean, Marcelo e Diogo sem o apoio e amizade de vocês eu não teria conseguido.

Às amigas: Fernandinha, Aninha, Dayane, Mari, Tina e Paty, por tantas risadas e longas horas de estudo.

Aos amigos da IB Catuaí, em especial a minha família PG, vocês tornaram tudo mais leve.

Aos amigos Mayara, José Perez e Everaldo, companheiros durante a condução dos meus experimentos fora do horário de expediente e nos finais de semana. Sem vocês não seria possível.

RESUMO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma doença foliar destrutiva em quase todos os países produtores de soja. Na tentativa de amenizar os impactos produzidos pela doença na soja objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do jasmonato de metila na indução de resistência à ferrugem asiática da soja por meio da severidade da doença e análise temporal da atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase, do perfil qualitativo e quantitativo dos compostos fenólicos e trocas gasosas. Plantas de soja da cultivar BRS 361, no estágio V₅, foram utilizadas no presente trabalho e para tanto foram pulverizadas com água, Tween 20 a 0,02 % e jasmonato de metila a 1,25 mM em casa de vegetação. Após 24 horas da pulverização dos produtos as plantas foram inoculadas com 1,4x10⁵ uredósporos/mL de *Phakopsora pachyrhizi* nas plantas controle foi aplicado água. Pelos resultados obtidos pode se verificar que o jasmonato de metila e Tween 20 foram eficientes em promover redução na severidade da doença. A aplicação de jasmonato de metila proporcionou aumento na atividade da quitinase e β -1,3-glucanase em folhas submetidas ou não à inoculação, independente do período de avaliação. Os compostos daidzeína, daidzina, malonil daidzina e coumestrol foram produzidos somente com a inoculação nas plantas pulverizadas com água. Tween 20 e jasmonato de metila induziram o acúmulo destes compostos fenólicos mesmo em plantas não inoculadas. A aplicação destes produtos também promoveu acúmulo de outros compostos fenólicos. A inoculação promoveu redução na eficiência fotossintética expressa pela redução das características fisiológicas. Jasmonato de metila e Tween 20 intensificaram o efeito negativo da inoculação na condutância estomática e transpiração, sem contudo, alterar a fotossíntese. Conclui-se que o jasmonato de metila e o Tween 20 podem ser considerados como compostos indutores de resistência à ferrugem asiática em soja.

Palavras-chave: *Glycine max*. Jasmonato. Indução de Resistência.

ABSTRACT

The Asian soybean rust, caused by the *Phakopsora pachyrhizi* fungus, is a destructive foliar disease in almost all soy producing countries. In the attempt of mellowing the impacts caused by this disease, this study aimed at evaluating the effect of methyl jasmonate on the induction of resistance to Asian soybean rust through the severity of the disease and the temporal analysis of the chitinase and β -1,3-glucanase enzymes' activities, as well as the qualitative and quantitative profiles of the phenolic compounds and gas exchange involved. Soy plants of the BRS 361 cultivar, in the V₅ stage, were sprayed with water, 0.02% *Tween* 20 and methyl jasmonate 1.25 mM in greenhouse. Twenty four hours after spraying, the plants were inoculated with 1.4×10^5 uredospores/mL of *Phakopsora pachyrhizi*, applying water to the witness plants. With the results obtained we may verify that the methyl jasmonate and *Tween* 20 were effective in promoting the reduction of disease severity. The application of methyl jasmonate increased the activity of chitinase and β -1,3-glucanase in leaves submitted or not to inoculation, regardless of the evaluation period. The compounds daidzein, daidzin, malonyl daidzin and coumestrol were produced only by plants sprayed with water (false-inoculated). *Tween* 20 and methyl jasmonate induced the accumulation of these phenolic compounds even in the plants not inoculated. The application of these products also promoted accumulation of other phenolic compounds. The inoculation promoted photosynthetic efficiency reduction expressed by the reduction of eco-physiological characteristics. The application of methyl jasmonate *Tween* 20 intensified the negative effect of inoculation in stomatal conductance and in transpiration, however, without altering photosynthesis. We conclude that methyl jasmonate and *Tween* 20 may be considered as Asian soybean rust resistance inducing compounds.

Keywords: *Glycine max*. Jasmonate. Resistance induction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do estágio de desenvolvimento inicial durante a interação de <i>P. pachyrhizi</i> com a planta hospedeira Uredósporo germinado (ug); tubo germinativo (tg); apressório (ap); hifa de penetração (hip); hifa primária (hp); hifa secundária (hs); haustório (hau) 18
Figura 2	Rota biossintética do jasmonato de metila.....24
Figura 3	Rota biossintética dos compostos fenólicos em <i>Glycine max</i> . Fenilalanina amônia-liase (PAL), 4-cinamato hidroxilase (C4H), 4-cumarato-CoA-ligase (4CL), chalcona sintase (CHS), chalcona redutase (CHR), chalcona isomerase (CHI), 6-flavonona hidroxilase (F6H), isoflavona sintase (IFS), isoflavona metil transferase (IMT)27
Figura 4	Variação diária da temperatura do ar (T) e da radiação solar durante o período de junho de 2013, evidenciando os dias de avaliações de trocas gasosas em <i>Glycine Max</i> (Londrina, 2013)....32
Figura 5	Escala diagramática de severidade da ferrugem asiática34
Figura 6	Severidade de ferrugem asiática em folhas de plantas inoculadas com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e submetidas à aplicação de diferentes produtos40
Figura 7	Limbo foliar de BRS 361 após 16 dias da inoculação com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> submetidas a aplicação de diferentes produtos: A e B- Água; C e D- Tween 20; E e F- Jasmonato de metila + Tween 2041

Figura 8	Atividade temporal de β -1,3-glucanase e quitinase em folhas de soja não inoculadas (A e C) ou inoculadas (B e D) com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> que receberam aplicação foliar de água (▼), Tween 20 (○) e jasmonato de metila + Tween 20 (●).....	44
Figura 9	Cromatograma de uma amostra composta por folhas de BRS 361 que receberam aplicação de jasmonato de metila + Tween 20 e foram inoculada com <i>P. pachyrhizi</i> coletadas 144 hai. (1) daidzina, (2) genistina, (3) malonil daidzina, (4) malonil genistina, (5) daidzeína, (6) genisteína e (7) coumestrol	46
Figura 10	Espectros de absorção no ultra violeta de isoflavonoides relacionados a defesa a patógenos em soja; (1) daidzina: TR= 12,66, (2) genistina: TR=17,20, (3) malonil daidzina: TR= 19,55, (4) malonil genistina: TR= 24,56, (5) daidzeína: TR=26,34, (6) genisteína: TR= 29,35 e (7) coumestrol: TR= 36,24	47
Figura 11	Taxa fotossintética (A) em folhas de soja após inoculação com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e no controle (não inoculado)	57
Figura 12	(A) Teor de clorofila em folhas de soja inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e submetidas a aplicação foliar de água, Tween 20 e jasmonato de metila; (B) Concentração temporal de pigmentos clorofilianos.....	60
Figura 13	(A) condutância estomática (gs) em folhas de soja inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ; (B) condutância estomática (gs) em folhas de soja inoculadas ou não <i>Phakopsora pachyrhizi</i> que receberam aplicação foliar de água, Tween 20 e jasmonato de metila; (C) condutância estomática temporal em soja que receberam aplicação de diferentes produtos.....	63

Figura 14	Avaliação temporal da concentração intracelular de CO ₂ (C _i) em plantas de soja que receberam aplicação de diferentes produtos: água, Tween 20 e jasmonato de metila.....	65
Figura 15	Eficiência de carboxilação (A/C _i) em plantas de soja. (A) plantas inoculadas e não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , (B) em diferentes períodos de avaliação	70
Figura 16	Eficiência instantânea do uso da água (A/E) em plantas de soja inoculadas e não com <i>Phakopsora pachyrhiz</i> em diferentes períodos de avaliação.....	71
Figura 17	Razão entre concentrações de CO ₂ intra/extracelular (C _i /C _a) em plantas de soja inoculadas e não com <i>Phakopsora pachyrhiz</i> em diferentes períodos de avaliação.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração temporal de compostos fenólicos de folhas de soja (<i>Glycine max</i>) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	49
Tabela 2	Concentração temporal de rutina em folhas de soja (<i>Glycine max</i>) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	54
Tabela 3	Transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em folhas de soja (<i>Glycine max</i>) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	67
Tabela 4	Temperatura foliar de soja (<i>Glycine max</i>) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Ferrugem asiática	16
2.2	Defesa vegetal	20
2.3	Jasmonato de metila	23
2.4	<i>Tween 20</i>	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Caracterização do ambiente e descrição das plantas	31
3.2	Aplicação dos produtos	32
3.3	Inoculação de plantas com <i>P. pachyrhizi</i>	33
3.4	Avaliação da severidade da ferrugem asiática	33
3.5	Avaliação da atividade enzimática	34
3.6	Análise de compostos fenólicos	35
3.7	Avaliações de trocas gasosas e pigmentos clorofilanos	37
3.8	Análises estatísticas	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Avaliação da severidade da ferrugem asiática da soja	39
4.2	Avaliação da atividade enzimática	42
4.3	Análise de compostos fenólicos	45
4.4	Avaliações de trocas gasosas	56
5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	89

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] representa atualmente um dos expoentes do agronegócio brasileiro, contribuindo de forma significativa para a balança comercial, sendo a cultura que mais cresceu nas últimas três décadas. Segundo dados do Ministério da Agricultura (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013), a cultura da soja corresponde no presente a 49% da área plantada no país. Paralelamente a este crescimento, merece destaque, o aumento dos problemas fitossanitários que afetam esta cultura, sendo relatadas mais de 100 espécies de patógenos, das quais, cerca de 35 são de grande importância econômica.

Dentre essas doenças, a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, é considerada um grave problema para o agronegócio dos países produtores de soja. Sua rápida expansão e alto potencial de prejuízo tornaram essa doença uma das principais enfermidades da cultura, que pode atingir níveis que inviabilize a colheita (YORINORI et al., 2005).

Embora o controle químico seja a medida mais utilizada para o combate da ferrugem asiática, o uso indiscriminado de agroquímicos causa danos ao ambiente, de forma irreversível, acarretando desequilíbrio ambiental e favorecendo também a seleção de novas raças fisiologicamente resistentes.

Uma técnica que tem merecido destaque é o estudo e uso da indução de resistência, método usado para reduzir a severidade de doenças causadas por fitopatógenos. Trata-se do fenômeno pelo qual as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa latentes ativados, sendo as mesmas capazes de responder de maneira rápida, ao ataque posterior de pragas e patógenos.

Uma das formas de indução ocorre através da aplicação de fitorreguladores como os jasmonatos, etileno e ácido salicílico. O ácido jasmônico (AJ) e seu éster jasmonato de metila destacam-se como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica das plantas por alterar fundamentalmente a biossíntese de compostos bioativos. No entanto, os modos de ação geralmente envolvem rotas metabólicas multivariadas, que são específicas para cada espécie vegetal.

A análise dos mecanismos bioquímicos e respostas ecofisiológicas durante a interação soja-ferrugem é de grande importância para auxiliar nos programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares resistentes ou métodos eficientes no controle do fungo. Para isso, análises de acúmulo de compostos secundários e atividades de enzimas-chave podem auxiliar na compreensão da relação da rota dos fenilpropanóides com a resposta de defesa da soja ao fungo.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do jasmonato de metila na indução de resistência à ferrugem asiática avaliando-se: a severidade da doença, atividade das enzimas quitinase (EC 3.2.1.14) e β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6), acúmulo temporal de compostos fenólicos e análise de características fisiológicas (fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de carbono, temperatura foliar e teor de clorofila).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ferrugem asiática

A soja é originária das regiões norte e central da China e foi domesticada há cerca de cinco mil anos sendo uma das primeiras plantas a serem cultivadas. Na segunda década do século XX, a soja começou a receber destaque devido à composição química dos grãos com destaque para seu elevado teor de óleo e proteína, despertando o interesse das indústrias. No Brasil sua produção comercial teve início no final da década de 60, como uma opção de cultura de verão em sucessão ao trigo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2013).

Atualmente a soja é um dos pilares centrais do agronegócio brasileiro, na safra 2012/2013 o Brasil alcançou uma produção recorde de 81.456,7 milhões de toneladas, comparada com 66.383,0 milhões de toneladas em 2011/12, representando um aumento de 22,7% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013). Com a produção elevada de 2013, o Brasil alcançou o 1º lugar no ranking mundial dos principais países produtores de soja (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS, 2013).

Entretanto, muitos fatores interferem no desenvolvimento da cultura prejudicando ou limitando a sua máxima produção como: fatores climáticos (chuva, temperatura, fotoperíodo); solos (adubação); variedades (recomendada para cada região), plantas daninhas (competição inicial ou interferência na colheita); doenças (limitantes no crescimento foliar e na produção); pragas (destruição parcial ou total da planta); e manejo da cultura (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2011).

Entre esses fatores limitantes, as doenças causam redução da produtividade que pode chegar a 100%, pois estas podem danificar, desde a parte aérea até o sistema radicular da planta. Hoje no Brasil são descritas cerca de 40 tipos de doenças que acometem a soja, causadas pelos principais patógenos (fungos, vírus, bactérias e nematoides), no qual o grau de importância pode variar de acordo com a região e a intensidade da doença (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2011).

Uma doença de grande interesse econômico é a ferrugem asiática causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, com custos que englobam os gastos do controle com fungicidas mais as perdas de produtividade. Desde o seu surgimento na safra de 2000/2001 no Brasil e até a safra de 2010/2011 foram estimadas perdas na ordem de US\$ 15 bilhões (GODOY et al., 2011). O primeiro relato de ferrugem asiática no continente Americano foi no Paraguai em março de 2001 e no mesmo ano, em maio, no Paraná (MOREL; YORINORI, 2002). Na safra brasileira de 2012/2013, os estados RS, SC, PR, SP, MG, MS, DF, GO, MT, BA, MA, RO apresentaram incidência da doença, que gerou um custo de US\$1,94 bilhões para o controle dessa doença (CONSORCIO ANTIFERRUGEM, 2011).

Tal doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento varia entre 18°C a 28°C. Em condições ótimas, as perdas na produtividade podem variar de 10% a 80% (ZAMBOLIN, 2006). A infecção reduz a atividade fotossintética pela destruição dos tecidos foliares, causando abscisão prematura das folhas. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior a perda do rendimento e da qualidade (YANG et al., 1991).

A penetração do fungo na folha do hospedeiro é direta pela epiderme intacta (ZAMBOLIN, 2006; GOELLNER et al., 2010). Durante a germinação os

uredósporos, oriundos de urédias, formam um tubo germinativo curto, delimitado por um apressório terminando em um septo. Da base do apressório, uma hifa de penetração se desenvolve e penetra pela cutícula e parede da célula do hospedeiro por força mecânica e liberação de enzimas. Uma vez dentro do espaço intercelular e no tecido do mesófilo a hifa de penetração expande-se podendo formar hifas secundárias (ZAMBENEDETTI-MAGNANI; ALVES; ARAÚJO, 2007). Por fim, diferencia-se em célula mãe do haustório ao entrar em contato com a célula do mesofilo, realizando a penetração da célula hospedeira e a formação do haustório (Figura 1). Neste tipo de penetração pode ocorrer uma série de eventos que levam à formação de barreiras estruturais pela planta, os quais podem levar à resistência ao patógeno (ALMEIDA et al., 2005).

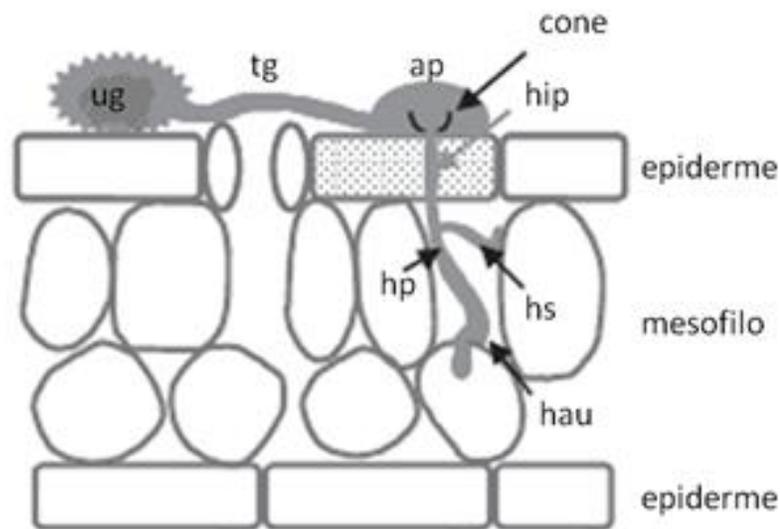


Figura 1 Esquema do estágio de desenvolvimento inicial durante a interação de *P. pachyrhizi* com a planta hospedeira Uredósporo germinado (ug); tubo germinativo (tg); apressório (ap); hifa de penetração (hip); hifa primária (hp); hifa secundária (hs); haustório (hau)

Fonte: (modificado de Goellner et al., 2010).

Nas etapas iniciais de infecção, o patógeno causador da ferrugem asiática apresenta característica de fungo necrotrófico, uma vez que provoca acúmulo de peróxido de hidrogênio e morte celular nas células epidérmicas e, quando atinge a camada foliar do mesófilo, passa a comportar-se como patógeno biotrófico por meio da formação de haustórios (LOEHRER et al., 2008). Esta morte celular geralmente não impede a penetração do fungo no mesófilo foliar, e pode ser induzida pelo fungo para evitar a ativação das respostas de defesa da planta e para facilitar o seu ingresso nos espaços intercelulares da folha (HOEFLE et al., 2009).

Patógenos biotróficos ativam a rota de defesa relacionada com o ácido salicílico, que desencadeia a resposta de hipersensibilidade (HR), privando o patógeno de nutrientes para o seu desenvolvimento, enquanto que os necrotróficos ativam a rota do jasmonato (BARI; JONES, 2009). Esta estratégia permite ao patógeno da ferrugem asiática contornar as defesas relacionadas com o ácido salicílico.

O controle da ferrugem asiática é obtido através de diversas medidas conjuntas. São recomendadas a utilização de cultivares de ciclo precoce; semeaduras no início da época recomendada para cada região; ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário; vistoria das lavouras e utilização de fungicidas com o aparecimento dos sintomas ou preventivamente (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2011). Apesar de eficazes, os fungicidas são de alto custo e, na maioria das vezes, são necessárias duas ou mais aplicações, onerando os custos de produção. Além disso, o uso contínuo do mesmo princípio ativo pode levar o fungo a uma pressão de seleção que permite selecionar indivíduos adaptados e desenvolver uma população resistente a determinadas moléculas químicas (VALENCIO, 2012). Portanto, outras estratégias de controle economicamente viáveis com boa relação custo benefício poderiam contribuir para o manejo da doença.

Até o momento foram identificados e mapeados seis genes de resistência para a ferrugem asiática patógeno-específico, sendo denominados de *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp6* (MORALES et al., 2013). Porém, das fontes de resistência já descritas na literatura, aquelas com os genes *Rpp1* e *Rpp3* tiveram a quebra da resistência pela ferrugem no Brasil (ARIAS et al., 2004) e, recentemente, um estudo mostrou a quebra da resistência ao *Rpp6* nos EUA (PAUL et al., 2013).

De acordo com Balardin e Madalosso (2006) para a otimização do controle de doenças da soja se faz necessária a utilização de medidas que aumentem as defesas da planta dificultando o desenvolvimento da doença.

A indução de resistência é uma ferramenta promissora para possibilitar o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, com expressão acentuada da resistência à doença ou elaboração de novos agroquímicos que estimulem o mecanismo de defesa da planta (VIJAYAN et al., 1998).

2.2 Defesa vegetal

As plantas são constantemente expostas a fungos, bactérias, vírus, nematoides e insetos. Com isso os mecanismos de defesa foram aperfeiçoados durante a coevolução e, na grande maioria das vezes, os vegetais são resistentes ao ataque de patógenos (AGRIOS, 2005). A resistência pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos.

De um modo geral, as plantas possuem um sistema complexo de defesa que pode ser dividido em pré-formados e pós-formados, abrangendo estratégias estruturais e bioquímicas. As estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto as bioquímicas atuam através da produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou

criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (MAZARO, 2007).

Os fatores de resistência pré-formados ou naturais já estão presentes nas plantas antes do contato com os patógenos. Eles são as ceras, cutícula, tricomas, além de substâncias químicas como flavonoides, encontradas em altas concentrações antes da infecção (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Os pós-formados (inativos ou latentes) são produzidos e/ou ativados em resposta a agentes indutores ou presença dos patógenos. Esses mecanismos estão envolvidos na formação de barreiras estruturais, tais como halo, papila, camada de cortiça, lignificação da parede celular, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, e na síntese de compostos que funcionam como barreiras bioquímicas, como espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas à patogênese e fitoalexinas (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Um método promissor para o controle de doenças em plantas é a utilização de potencializadores ou indutores de resistência, os quais permitem que a própria planta aumente sua resistência a ataques subsequentes e apresente proteção contra uma variedade de outros patógenos, agindo em regiões distantes do sítio de indução (AGRIOS, 2005). Esta forma de defesa é conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) ou Resistência Sistêmica Induzida, que são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes (STICHER et al., 1997).

A indução está correlacionada com a ativação de vários mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com elicitores, sendo dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação do patógeno, para que ocorram mudanças específicas no metabolismo vegetal (BONALDO et al., 2005). Estas respostas envolvem ativação da transcrição de genes, abertura de canais de íons, modificações do status de fosforilação das proteínas e ativação de enzimas pré-formadas que irão

realizar modificações nos metabolismos primários e secundários (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Relativamente pouco se sabe a respeito do tempo de indução do mecanismo de resposta de defesa durante as infecções de ferrugem asiática (ANGUELOVA-MERHAR et al., 2001).

Para o patossistema soja- *P. pachyrhizi*, as alterações nas atividades de enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência (ALMEIDA et al., 2012). Entre essas enzimas, estão as β -1,3-glucanase e quitinase, as quais são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresse (WU; BRADFORD, 2003). As β -1,3-glucanases hidrolisam β -1,3-glucanas e as quitinases catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 das N-acetilglicosaminas, que estão presentes nas paredes celulares dos fungos (HOU; CHEN; LIN, 1998).

Estudos identificaram genes envolvidos na rota dos fenilpropanoides ativados durante a resposta de defesa da soja à ferrugem (VAN DE MORTEL et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2011). Como produto desta rota tem-se a lignina que irá reforçar as paredes celulares das plantas sendo um mecanismo de defesa induzido usado para proteção contra invasão do patógeno (NAOUMKINA et al., 2010). São produzidos também isoflavonoides, os quais têm sido descritos como umas das vias de defesa da soja contra ataque de insetos e doenças (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; ZHOU et al., 2011).

Entretanto, toda alocação de recursos para defesa pode ser considerada como custo geral (GAYLER et al., 2004), já que recursos internos da planta usados para o crescimento ou defesa são determinados pela competição por substrato comum de energia, sendo que a planta deve balancear os investimentos nesse processo. Fenótipos de plantas que são induzidos para a resistência sistêmica podem mostrar efeitos negativos sobre o seu crescimento e adequação quando não infectados (HEIL; BOSTOCK, 2002).

Para mensurar o custo de indução de resistência é necessário um hospedeiro suscetível no estado inteiramente não induzido (GAYLER et al., 2004). Algumas características fotossintéticas relacionadas com as trocas gasosas e a concentração de pigmentos apresentam extrema importância por serem considerados indicadores essenciais do comportamento da atividade fotossintética em plantas (BERGER et al., 2007).

2.3 Jasmonato de metila

O jasmonato de metila é o metil éster do fitormônio ácido jasmônico, formado por um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3. A biossíntese dos jasmonatos ocorre pela rota octadecanóide (Figura 2), conforme descrita a seguir (SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2008). A estimulação de uma fosfolipase A2 resulta na liberação intracelular do ácido linolênico (AL) da membrana plasmática, o qual é convertido, em uma reação catalisada por uma 13-lipoxigenase (LOX), a ácido 13-hidroperóxilinoleico (13-HPOT) nos cloroplastos. O 13-HPOT é convertido, pela catálise da aleno óxido sintase (AOS), o ácido oxo-fitodienoico (OPDA). Estas ciclopentanonas deixam o cloroplasto e podem se converter a oxo-pentenilciclopentanos (OPC) pela ação da aleno óxido ciclase (AOC), ambas as formas podem agir como moléculas sinalizadoras no citossol. Os OPC são metabolizados nos peroxissomos, nos quais são reduzidos pela enzima ácido 12-oxo-fitodienoicoreductase (OPR), formando o ácido 3-oxo-2-(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanóico, que, após β -oxidação, forma o ácido jasmônico (JA). Este pode ser metilado no citossol, pela ação do ácido jasmônico metiltransferase (JMT), formando o jasmonato de metila. A reação inversa (de-metilação) é catalisada pela esterase do jasmonato de metila.

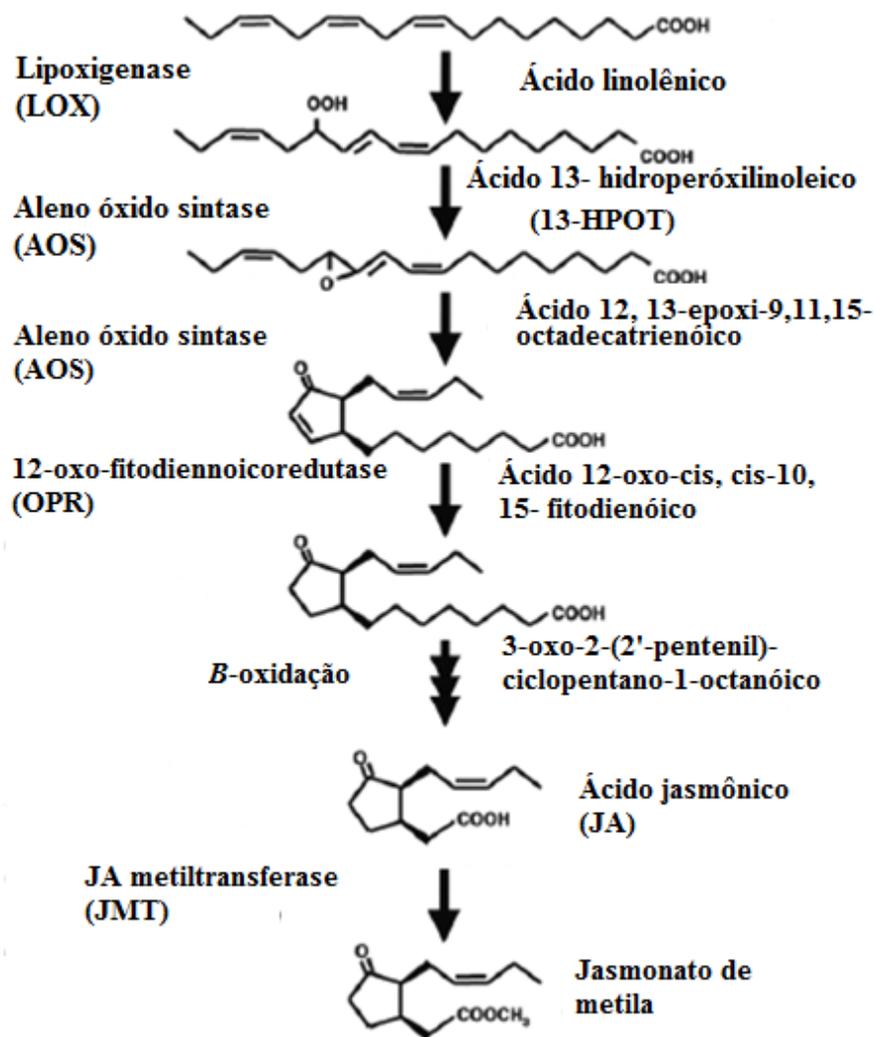


Figura 2 Rota biossintética do jasmonato de metila
Fonte: SASAKI et al. (2001)

Os jasmonatos participam do crescimento e desenvolvimento vegetal (GIMENEZ-IBANEZ; SOLANO, 2013), regulando processos como germinação de sementes, crescimento da raiz, fertilidade, amadurecimento de frutos e

senescência (CHEONG; CHOI, 2003; BROWSE, 2009). Esses compostos atuam também sinergisticamente ou antagonicamente com outros fitormônios, como etileno, ácido salicílico, auxina e ácido abscísico (SASAKI et al., 2001).

O nível destes fitormônios varia em função do tipo de tecido, fase do desenvolvimento e estímulo externo, sendo a atividade biológica do jasmonato de metila altamente dependente de sua concentração nas plantas. Em concentração baixa (1 até 10 μM) nos tecidos atua na indução da expressão gênica relacionada com a defesa da planta, enquanto que em concentrações elevadas (acima de 50 μM) provoca senescência, induzindo morte celular (MASON; MULLET, 1990).

Eles se destacam como compostos sinalizadores que ativam mecanismos de defesa da planta em resposta a estresses, como ferimento causado por pragas e patógenos (BROWSE, 2009), assim como aos estresses abióticos, tais como baixa temperatura, seca e salinidade (CHEONG; CHOI, 2003; DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2011). Tais compostos também estão envolvidos na regulação da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse (RUIZ-GARCÍA; GÓMEZ-PLAZA, 2013). A aplicação de forma exógena destes reguladores possibilita uma gama de bioensaios elucidativos das respostas de plantas aos estresses.

A indução da lipoxigenase via aplicação exógena de jasmonatos pode fazer com que uma planta suscetível suporte mais os ataques de patógenos ou, então, aumente sua capacidade de sintetizar outros derivados de compostos lipídicos usados em sua defesa (CHAICHANA et al., 2012). Baixas concentrações de jasmonatos podem induzir a produção de inibidores de proteinases e estimular a biossíntese de flavonoides e de sesquiterpenoides, entre outras substâncias (CREELMAN; MULLET, 1997).

Gális et al. (2006) identificaram um fator de transcrição regulado por jasmonato de metila que induz uma série de genes do metabolismo dos

fenilpropanoides. A partir da rota dos compostos fenólicos, conforme ilustrado na figura 3, são produzidas a lignina e as fitoalexinas isoflavonoides, que são extremamente importantes na resposta de defesa (FERRER et al., 2008). Esta via inicia-se por meio da reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) para formar o ácido trans-cinâmico e, a partir desse, a ativação de outras enzimas, como a chalcona sintase (CHS) e isoflavona sintase (IFS), e a síntese de compostos fenólicos mais complexos (YU; MCGONIGLE, 2005). Van de Mortel et al. (2007) observaram aumento na expressão de genes desta rota em plantas de soja inoculadas com ferrugem asiática.

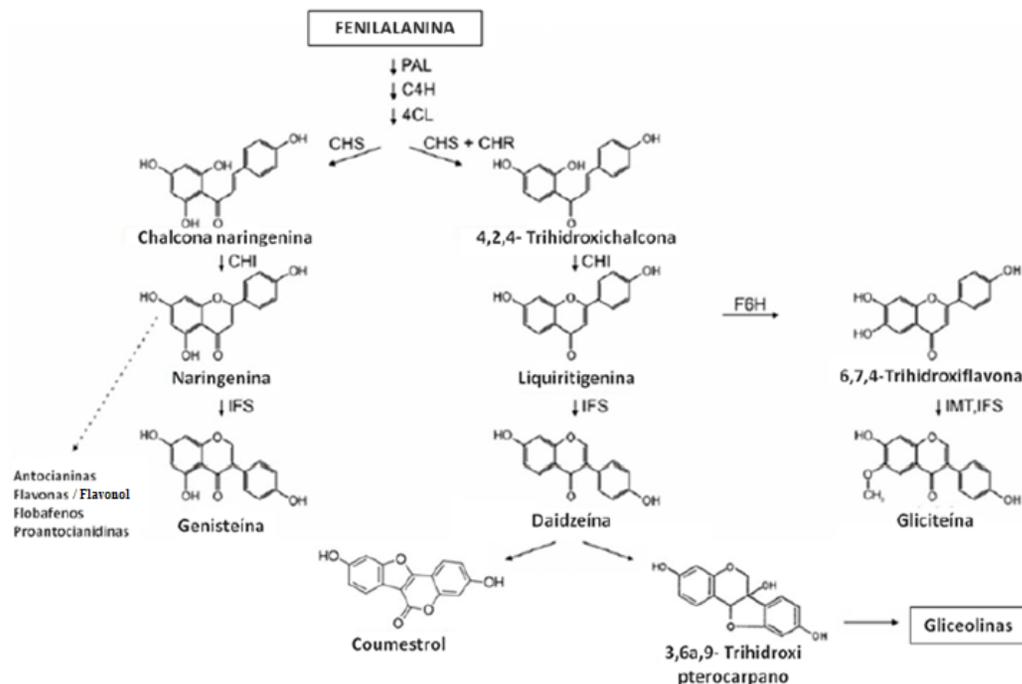


Figura 3 Rota biossintética dos compostos fenólicos em *Glycine max*. Fenilalanina amônia-liase (PAL), 4-cinamato hidroxilase (C4H), 4-cumarato-CoA-ligase (4CL), chalcona sintase (CHS), chalcona redutase (CHR), chalcona isomerase (CHI), 6- flavonona hidroxilase (F6H), isoflavona sintase (IFS), isoflavona metil transferase (IMT)

Fonte: (modificado de Dhaubhadel et al., 2003)

Nota: A daidzeína atua com precursora das fitoalexinas coumestrol e gliceolinas. A naringenina é a precursora para a formação da rutina.

As gliceolinas (pterocarpanos) e o coumestrol (coumestrans), além de outros isoflavonoides como a genisteína, daidzeína e gliciteína e seus glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), desempenham múltiplos papéis na defesa da soja, sendo diretamente tóxicos para alguns patógenos (GRAHAM, 1999; LYGIN et al., 2010; ZHOU et al., 2011), e relacionados inclusive à resposta a *P. pachyrhizi* (LYGIN et al., 2009).

A produção de jasmonato de metila pode estimular plantas vizinhas induzindo-as por via aérea a adquirirem resistência sistêmica antes da presença do patógeno, funcionando como um meio de comunicação intra e inter planta nas respostas de defesa (WASTERNAK; XIE, 2010). Este composto pode difundir para partes distantes da planta através da fase de vapor (KARBAN et al., 2000) ou por migração intercelular, possivelmente através do floema (RUIZ-MEDRANO, 2001).

Wu, Wang e Baldwin (2008) demonstraram que a resistência induzida pelo tratamento jasmonato de metila não é diretamente provocada por ele mas pelo seu produto desmetilado: ácido jasmônico. A indução pelo jasmonato na expressão gênica é controlada por moléculas repressoras da sinalização, e cuja degradação, sob estímulos ambientais, fornece uma rápida ativação do sistema (HOWE; JANDER, 2008). Nesse sistema, a proteína repressora JAZ é alvo de degradação via complexo proteossômico 26S dependente de ubiquitina, liberando a transcrição de genes responsivos à AJ (CHINI et al., 2007). No modelo atual, JA-Ile promove o reconhecimento de JAZ com o complexo SCFCOII, marcando a proteína JAZ com ubiquitina. A COII é uma proteína F-box, e esse tipo proteico é o responsável pela especificidade do complexo SCF ao alvo. O modelo para a atividade de COII é baseado na sinalização por auxina, onde a ligação do complexo SCFTIR1 às proteínas repressoras Aux/IAA resultam na expressão de genes dependentes de auxina (STASWICK, 2008).

Aplicação de jasmonato de metila foi eficaz na supressão do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em morango e infecção causada por *Colletotrichum acutatum* em ameixas (MOLINE et al., 1997; CAO et al., 2008). Além disso, melhorou a eficácia da levedura antagonista *Cryptococcus laurentii* para controle da podridão de mofo marrom e azul causado por *Monilinia fruticola* e *Penicillium expansum* em frutos de pêssigo (YAO; TIAN, 2005). Jasmonato de metila suprimiu o crescimento e germinação de *Alternaria alternata* (CHEN et al., 2014).

Divya, Puthusseri e Neelwarne (2014) observaram que a elicitação com jasmonato de metila promoveu aumento nos níveis de carotenoides, fenólicos totais, β -caroteno, clorofilas e ácido clorogênico em coentro. Entretanto, em soja reduziu o teor de clorofila, o CO_2 intercelular e a transpiração, assim como provocou redução da área foliar e na altura da planta, enquanto que aumentou o número de ramos (ANJUM et al., 2011). É relatado que genes envolvidos na fotossíntese são reprimidos pela ação do jasmonato de metila, como ribulose difosfato carboxilase/oxigenase, proteína de ligação clorofila a/b e captador de luz do complexo II (CHEONG; CHOI, 2003).

O efeito do jasmonato de metila na fotossíntese em pinheiro silvestre foi dose dependente aos 100 dias de aplicação, aumentando em 10 mM e reduzindo em 100 mM em relação ao controle (HEIJARI et al., 2005). Em artemísia, o jasmonato de metila melhorou a eficiência fotossintética expressa pela maior taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração interna de CO_2 e teor de clorofila total (AFTAB et al., 2011).

Plantas que utilizam recursos para defesa na ausência de pragas ou patógenos arcarão com custos energéticos que poderão refletir na sua produtividade. Em plantas que tiveram a defesa induzida por jasmonato e não foram atacadas por herbívoros produziram menos sementes do que as plantas

não induzidas (BALDWIN, 1998). Na presença do patógeno, o investimento em defesa deve valer a pena e as plantas induzidas deverão ser beneficiadas.

2.4 Tween 20

O *Tween 20* é um detergente não iônico que quebra a tensão superficial facilitando a dispersão dos produtos químicos sobre as folhas, muito utilizado nos estudos de ciências vegetais (HUNZICKER, 2009). No entanto, o *Tween 20* foi descrito com a habilidade de induzir duas redutases oxofitodienoato, OPR1 e OPR2 (BIESGEN; WEILER, 1999; HUNZICKER, 2009). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* o gene OPR1 foi identificado pela aplicação do *cis*-jasmone evidenciando a ativação de genes de defesa (BRUCE et al., 2008) tanto por *Tween 20* como pelo *cis*-jasmone. Estas enzimas (OPR) estão relacionadas na conversão do (-)-*cis*-OPDA em (+)-*cis*-OPDA, que é um precursor do ácido jasmônico (TANI et al., 2008). Demonstrando dessa forma o efeito sinérgico/indutor do *Tween 20* na resistência em plantas.

De acordo com Hunzicker (2009) o *Tween 20* pode alterar a composição de transcritos em *Arabidopsis thaliana* com características semelhantes aos padrões moleculares associados aos patógenos em repostas de defesa. Seus resultados sugerem que *Tween 20* atua como um veículo para os ácidos graxos saturados, que por sua vez, são indutores de uma resposta imune inata típica. O uso desse detergente provoca alterações na fisiologia das plantas, mesmo quando usado em níveis baixos não apresentando danos visíveis às mesmas. Uma implicação importante dos achados é que ao usar *Tweens* em experimentos verificando reações de defesa, compostos de teste podem vir inativos contra a resposta conferida pelo próprio detergente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do ambiente e descrição das plantas

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, na Embrapa Soja no Distrito da Warta, em Londrina, PR. As condições climáticas no período em que foi realizado o estudo encontram-se na figura 4.

Foram utilizadas plantas de soja do genótipo BRS 361, considerado suscetível à ferrugem asiática. As sementes foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja. O experimento foi instalado no delineamento em blocos ao acaso, com seis blocos, cada vaso contendo cinco plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (UR 65%, 28 °C) até o estágio V₅ (FEHR et al., 1971) e então submetidas à aplicação exógena dos diferentes produtos utilizando pulverizador pressurizado com CO₂.

Os ensaios foram montados em arranjo fatorial com três produtos (água, *Tween* 20 e jasmonato de metila), duas inoculações (inoculados e não inoculados) e seis repetições por período de avaliação.

Para obtenção das amostras para análise de enzimas e compostos fenólicos descritos respectivamente nos item 3.5 e 3.6 foi separado um vaso para cada período de coleta, totalizando 144 vasos. Para avaliações de trocas gasosas e pigmentos clorofilianos descritos a seguir no item 3.7 foram plantados 36 vasos.

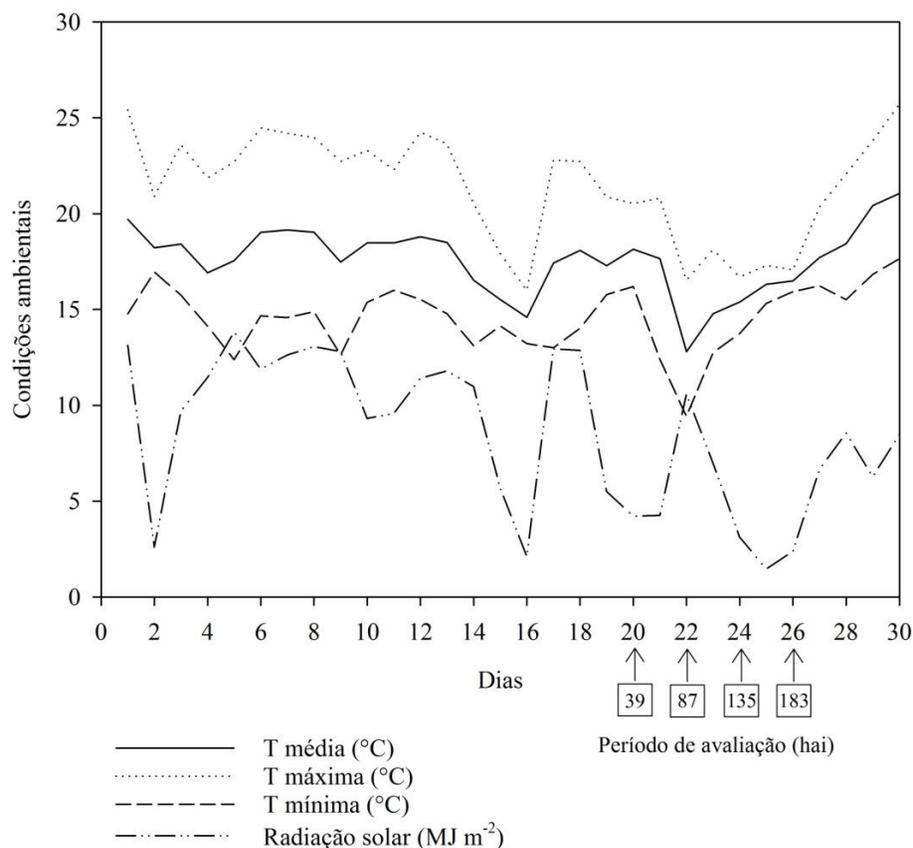


Figura 4 Variação diária da temperatura do ar (T) e da radiação solar durante o período de junho de 2013, evidenciando os dias de avaliações de trocas gasosas em *Glycine Max* (Londrina, 2013)

3.2 Aplicação dos produtos

Para o tratamento controle foi utilizada água. O surfactante utilizado foi o *Tween 20* (Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano) a 0,02% (Sigma). O jasmonato de metila (Sigma) foi utilizado na concentração de 1,25 mM preparado em *Tween 20* a 0,02 % (JM + T20). As plantas tratadas com jasmonato de metila foram mantidas em outra casa de vegetação por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura e umidade, para evitar a indução nas

plantas controle (Água e *Tween* 20), já que o jasmonato de metila é conhecido por ser um fito regulador volátil (SEO et al., 2001).

3.3 Inoculação de plantas com *P. pachyrhizi*

Após 24 horas da pulverização dos produtos descritos acima, as plantas foram inoculadas e falso-inoculadas (controle). Para o preparo do inóculo de *P. pachyrhizi* o fungo foi previamente mantido na cultivar BRS 316, em casa de vegetação, na Embrapa Soja. Os esporos foram coletados com leves batidas nas folhas com uredíniossoros, sobre papel branco e acondicionados em microtubos. Em seguida, uma suspensão foi preparada com água destilada contendo *Tween* 20 a 0,01%, e ajustada para uma concentração final de $1,4 \times 10^5$ uredósporos/mL. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob nebulização para estimular o processo infeccioso, uma vez que necessita de alta umidade, temperatura de 23 °C a 25 °C e umidade relativa > 95% em ausência de luz por 12 horas. As plantas controle receberam apenas a solução de água + *Tween* 20 (0,01%), contudo foram submetidas às mesmas condições que as inoculadas.

3.4 Avaliação da severidade da ferrugem asiática

A severidade da ferrugem asiática foi avaliada 16 dias após inoculação das plantas, em folhas V₂, utilizando uma escala proposta por Godoy et al. (2006). Tal escala leva em consideração a % de área foliar infectada e varia de 0,6% a 78,5% (Figura 5).

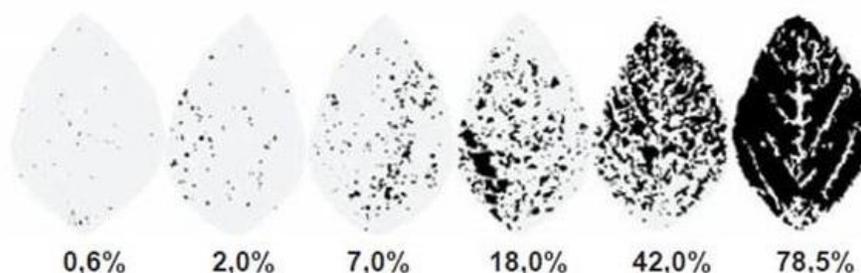


Figura 5 Escala diagramática de severidade da ferrugem asiática
Fonte: (GODOY et al., 2006)

3.5 Avaliação da atividade enzimática

Para determinação da atividade das enzimas, coletaram-se folhas V_4 e V_5 , utilizando duas plantas por amostra. As coletas foram realizadas às 48, 96, 144 e 192 horas após a inoculação (hai). Folhas de plantas não inoculadas também foram coletadas nos mesmos períodos. As amostras foram armazenadas individualmente em pacotes de papel alumínio e imediatamente congeladas em N_2 líquido e armazenadas em ultrafreezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$. De cada extrato foliar obtido procederam-se aos ensaios enzimáticos em triplicata.

Foi determinada a atividade da quitinase e β -1,3-glucanase. A concentração total de proteína em cada amostra foi determinada seguindo o método de Bradford (1976).

O extrato foliar foi obtido pela maceração de 0,3 g de tecido foliar triturados em almofariz em N_2 líquido com adição de polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% (p/v). O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $20.000 \times g$, temperatura $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 25 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

A atividade da quitinase foi determinada de acordo com método proposto por Robert e Selitrennikoff (1988) modificado por Harman et al. (1993), utilizando-se como substrato o *p*-nitrofenil- β -D-N,N'-diacetilquitobiose (PNP) (Sigma-Aldrich, São Paulo). O sistema de incubação consistiu da adição de alíquota de 20 μ L do sobrenadante obtido como descrito anteriormente, a uma mistura contendo 470 μ L do tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 10 μ L de PNP (2 mg mL⁻¹) e mantido a 37 °C por 2 h. A reação foi paralisada acrescentando 0,5 mL de carbonato de sódio 0,2 M e as absorvâncias determinadas no comprimento de onda 410 nm. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 7×10^4 mM⁻¹.cm⁻¹ sendo a atividade da quitinase expressa em mM de *p*-nitrofenil produzido por min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da β -1,3-glucanase foi determinada conforme método descrito por Lever (1972), com modificações: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em substituição à hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (MILLER, 1959). A reação foi constituída de 230 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 250 μ L da solução de substrato da laminarina (4 mg mL⁻¹) e 20 μ L do extrato vegetal. O sistema foi incubado a 45 °C por 30 min, e após este período, acrescentou-se à reação 1 mL de DNS e, em seguida, esta mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min. Após o resfriamento em gelo até 30°C a absorvância das amostras foi determinada a 540 nm sendo os resultados expressos em unidades de absorvância por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.6 Análise de compostos fenólicos

As amostras foram compostas por uma folha V₅ coletadas 48, 96 e 144 hai. Folhas de plantas não inoculadas também foram coletadas nos mesmos períodos. As amostras foram armazenadas individualmente em embalagens de

papel alumínio em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20 °C) até a extração e análise, que foram realizadas de acordo com metodologia padrão do laboratório de Ecologia Química da Embrapa Soja, descritas a seguir.

No momento da extração, as folhas foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido e colocadas em tubo falcon. Posteriormente foram pesadas (500 mg), acrescidas de 5 mL de metanol 90% e submetidas ao banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram então centrifugadas a 9.880 x g a 4 °C por 12 min., secas à vácuo, ressolubilizadas em 1,5 mL de metanol 80% e homogeneizadas manualmente. Em seguida, os extratos vegetais foram filtrados em membrana Millipore® 0,45 µm e transferidos para tubos (vials) do amostrador automático e analisados CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) – Shimadzu – modelo Prominence.

Os extratos metanólicos das amostras foram analisados em coluna C18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 µM). Alíquotas de 10 µL foram injetadas automaticamente no equipamento, com controlador CBM-20A; detector SPD-20A; desgaseificador DGU 20A5; bomba LC-20AT; amostrador automático SIL-20A e forno CTO 20A. A fase móvel foi composta por dois solventes: (A)-2% de ácido acético (HOAc) e (B): uma mistura de metanol, ácido acético e água MilliQ® (MeOH:HOAc:H₂O; 18:1:1). O sistema de gradiente linear utilizado na análise partiu da condição inicial com 75% de A e 25% de B atingindo, após 40 min, a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B, onde foi mantida por 5 min. Aos 45 min, voltou à situação inicial permanecendo por 5 min, antes da injeção seguinte. O fluxo do solvente foi de 1 mL minuto⁻¹ e o registro na região do ultravioleta (UV) foi obtido no comprimento de onda 260 e 280 nm.

As concentrações dos isoflavonoides agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) das formas 7-O-glicosídeos (daidzina, glicitina, genistina), malonil glicosídica (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilglicitina e 6''-O-

malonilgenistina), flavonoide rutina (quercitina 3-*O*-rutinosídeo) e fitoalexina coumestrol foram identificados por meio da comparação de espectro e tempo de retenção dos padrões com o espectro e tempo de retenção de cada amostra analisada.

A área do pico de cada substância identificada foi medida e multiplicada pelo fator de correção de cada composto padrão, levando-se em consideração a massa inicial do tecido e o volume de ressolubilização. Para a obtenção do fator de correção de cada composto, diferentes concentrações dos padrões de isoflavonas e ácidos fenólicos (6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram injetadas no CLAE. A partir dos valores das áreas dos compostos padrão e de suas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e obtida uma equação de regressão linear e o seu respectivo fator de correção.

3.7 Avaliações de trocas gasosas e pigmentos clorofilanos

As avaliações de trocas gasosas e pigmentos clorofilanos foram realizadas em folíolos centrais V_4 , anteriormente marcados às 39, 87, 135 e 183 hai, entre 9 e 10 horas da manhã. Foi utilizado analisador portátil de fotossíntese (IRGA), modelo LCpro-SD da marca ADC, pertencente ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal/Embrapa Soja. Foi utilizada radiação fotossintética ativa de 1044 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos: fotossíntese (taxa assimilatória líquida de CO_2), transpiração, condutância estomática, concentração de CO_2 intercelular e temperatura foliar. A partir destes dados foram calculados os seguintes parâmetros: a razão entre concentrações de CO_2 intra/extracelular (C_i/C_a), a eficiência instantânea do uso da água (A/E) e a eficiência de carboxilação (A/C_i).

O teor de pigmentos clorofilanos foi determinado indiretamente por meio do índice SPAD, utilizando o clorofilômetro SPAD-502 (Minolta, Japão),

também pertencente ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal/Embrapa Soja. A partir do índice SPAD obtido no clorofilômetro, foi calculado o teor de clorofila total utilizando-se a equação descrita a seguir, que foi gerada em ensaios de calibração e validação realizados na Embrapa Soja (dados não publicados):

$$\text{Teor de clorofila (mg cm}^{-2}\text{)} = ((\text{SPAD}) * 0,0007) - 0,0071 \quad (1)$$

3.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise exploratória e uma vez atendidos os pressupostos foi realizada a análise de variância (ANOVA). Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os programas estatísticos utilizados foram os pacotes SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2009) e Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da severidade da ferrugem asiática da soja

A aplicação de JM + T20 e *Tween 20* promoveram redução acentuada na severidade da ferrugem asiática em plantas de soja (Figuras 6 e 7).

Os resultados observados neste ensaio estão de acordo com os obtidos em diversos trabalhos, que comprovam a eficácia do jasmonato de metila na redução da severidade de inúmeras doenças. Embora alguns destes trabalhos utilize o *Tween 20* como surfactante, os efeitos são atribuídos prioritariamente ao jasmonato de metila. Conforme visto neste estudo e nos trabalhos de Graça (2012) e Dousseau (2013) o *Tween 20* possui efetividade na indução de respostas a patógenos devendo ser considerado. A redução da severidade relacionada à aplicação de jasmonato de metila foi verificada na supressão das doenças causadas por *Botrytis cinerea* em morango (MOLINE et al., 1997), *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* ou *Plectosphaerella cucumerina* em *Arabidopsis thaliana* (THOMMA et al., 2000), *Monilinia fructicola* em frutos de cereja doce (YAO; TIAN, 2005), *Erysiphe necator* em videira (BELHADJ et al., 2006) e *Colletotrichum acutatum* em ameixas (CAO et al., 2008).

O efeito do jasmonato de metila na redução da severidade de doenças de origem fúngica pode ser direto, como na supressão do crescimento do fungo e germinação de esporos de *Alternaria alternata* (CHEN et al., 2014). No entanto, alguns trabalhos demonstram que o efeito é indireto, ou seja, na indução de resistência, como o observado para *A. brassicicola* em *Arabidopsis thaliana* (THOMMA et al., 1998).

Graça (2012) e Dousseau (2013) também observaram o efeito eliciador do *Tween 20*, respectivamente para *G. max* e *Piper mollicomum*.

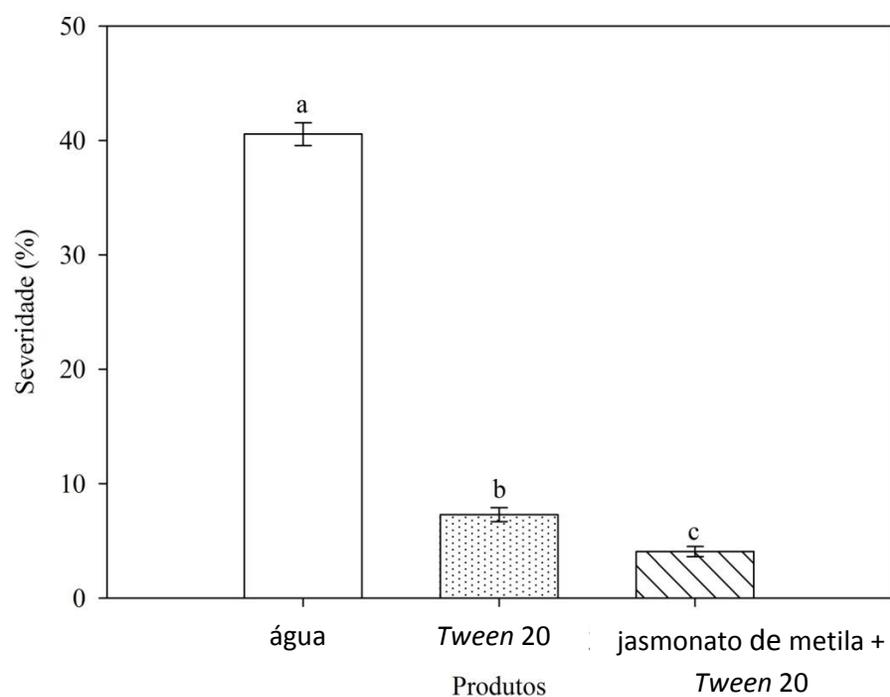


Figura 6 Severidade de ferrugem asiática em folhas de plantas inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e submetidas à aplicação de diferentes produtos

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 48 repetições para cada produto. CV=10,15%.

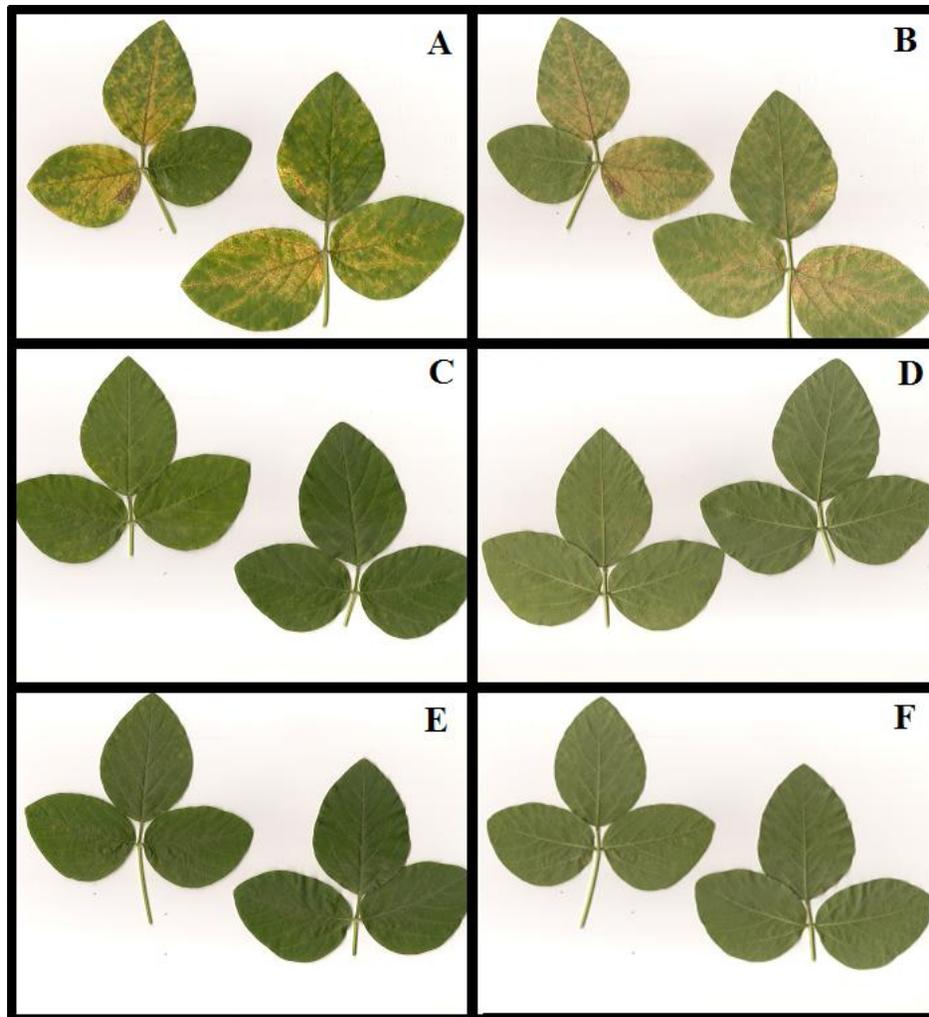


Figura 7 Limbo foliar de BRS 361 após 16 dias da inoculação com *Phakopsora pachyrhizi* submetidas a aplicação de diferentes produtos: A e B- Água; C e D- *Tween 20*; E e F- Jasmonato de metila + *Tween 20*

Nota: Superfícies adaxial (A, C e E) e abaxial (B, D e F); Digitalizadas em scanner de mesa (HP Photosmart C4680 All-in-one Printer).

4.2 Avaliação da atividade enzimática

A atividade da quitinase e β -1,3-glucanase foi superior em folhas de soja inoculadas em comparação com as não inoculadas, independente dos produtos aplicados (Figura 8).

A aplicação de JM + T20 proporcionou aumento na atividade dessas enzimas em plantas submetidas ou não à inoculação, independente do período de avaliação (Figura 8). A aplicação de *Tween 20* também proporcionou aumento na atividade em comparação com a água, independente da inoculação, embora com intensidade sempre menor que o JM + T20 (Figura 8).

Os resultados para ambas as enzimas foram distintos em função do período de avaliação. Nas plantas não inoculadas e com aplicação de *Tween 20* observou-se a maior atividade da β -1,3-glucanase em comparação com a água, exceto no período de 96 hai. Entretanto, em todos os períodos, as plantas que foram inoculadas apresentaram atividade enzimática superior exceto em 192 hai, quando não diferiu da água (Figura 8).

O *Tween 20* proporcionou aumento na atividade da quitinase, em relação à água, nas plantas não inoculadas, somente nos períodos de 48 e 192 hai (Figura 8). Contudo nas plantas inoculadas a atividade da quitinase foi semelhante nas plantas pulverizadas com o *Tween 20* e com a água, exceto no período de 48 hai, quando a atividade da enzima foi maior quando se aplicou *Tween 20* em comparação com a água.

Pode-se sugerir com estes resultados que a inoculação induz a atividade destas enzimas, conforme também observado por Almeida et al., 2012, em plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*.

Em trigo Domiciano et al. (2010) demonstraram que a atividade da quitinase foi maior nos estádios mais avançados de infecção por *Bipolaris sorokiniana*, causador da podridão comum em folhas dessa cultura. Desse modo,

pode-se sugerir que a atividade destas enzimas estaria associada com os mecanismos de defesa das plantas a estresses bióticos (MOHAMMADI et al., 2002; DOMICIANO et al., 2010; CRUZ et al., 2013) e abióticos (CAMPOS et al., 2004; KUNH, et al. 2006) em diferentes espécies vegetais.

Segundo Cruz et al. (2013) a coexistência de quitinase e β -1,3-glucanase é importante para a restrição de colonização por *P. pachyrhizi* em tecido foliar de soja. Essas enzimas participam da defesa das plantas a patógenos por meio da ação hidrolítica respectivamente, da quitina e β -1,3-glucana, presentes nas paredes celulares de alguns fungos, resultando na liberação de oligossacarídeos que podem atuar como eliciadores de mecanismos de defesa das plantas (MOHAMMADI et al., 2002). A superexpressão de genes de quitinase e β -1,3-glucanase em plantas tem aumentado a resistência das plantas a diversos patógenos (VAN LOON, 1997).

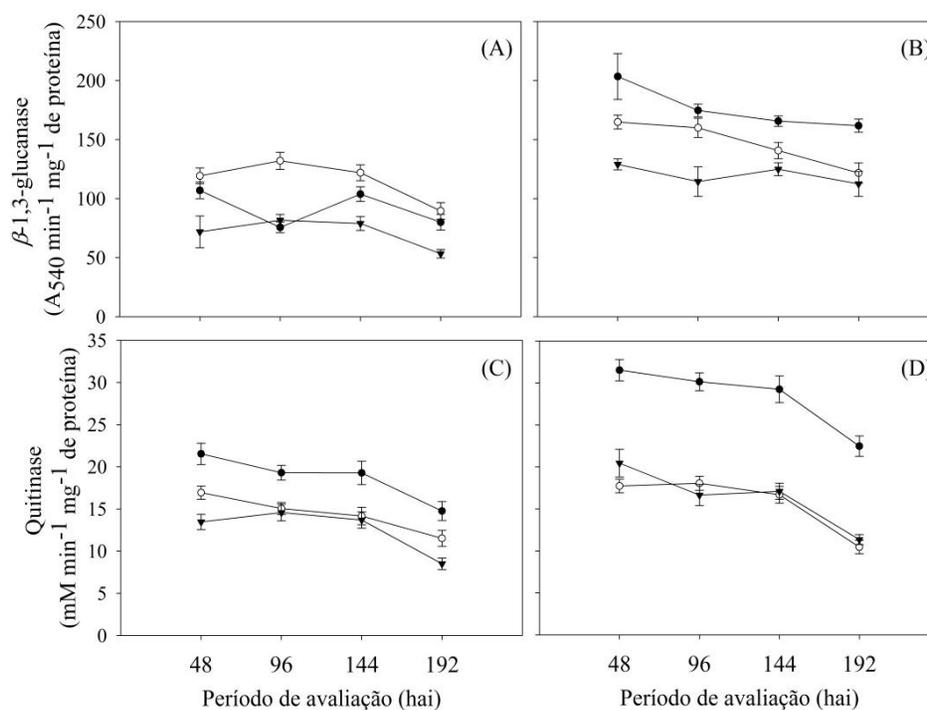


Figura 8 Atividade temporal de β -1,3-glucanase e quitinase em folhas de soja não inoculadas (A e C) ou inoculadas (B e D) com *Phakopsora pachyrhizi* que receberam aplicação foliar de água (▼), Tween 20 (○) e jasmonato de metila + Tween 20 (●)

Nota: As barras indicam o erro padrão da média das seis repetições.

Possivelmente este aumento na atividade dessas enzimas favoreceu a redução na severidade da ferrugem pela aplicação de JM + T20 observada neste ensaio (Figura 6).

Resultados contrários foram obtidos por Cruz et al. (2013) que observaram aumento na severidade de ferrugem asiática em soja tratada com ácido jasmônico. Por outro lado, segundo Pereira et al. (2009) a redução da severidade da ferrugem do cafeeiro não foi correlacionada com atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase.

Em outros patossistemas, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, a aplicação de jasmonato de metila acarretou maior atividade enzimática da β -1,3-glucanase em cana-de-açúcar reduzindo o número de ovos de *Meloidogyne incognita* por planta (GUIMARÃES et al., 2010). Plantas de trigo e *Arabidopsis thaliana* mutantes para a rota de ácido jasmônico foram resistentes a *Fusarium graminearum* mostrando que a rota ácido jasmônico aumentou a suscetibilidade das plantas à infecção por fungos devido à diminuição da transdução de sinal mediada por ácido salicílico (MAKANDAR et al., 2010).

A redução na severidade da ferrugem observada também após aplicação do *Tween* 20 pode estar relacionada ao aumento na atividade dessas enzimas em relação à água.

4.3 Análise de compostos fenólicos

Os tratamentos afetaram significativamente todos os fatores e as interações entre eles, exceto período de avaliação, produto x inoculação, inoculação x período, para daidzina, produto x inoculação para genisteína, e inoculação x período para genistina (APÊNDICE A). Assim, é possível se observar que o acúmulo desses compostos variou de acordo com o produto aplicado, com a inoculação com *P. pachyrhizi* e o período de avaliação. Foi observada para todos os compostos interação tripla entre os fatores estudados (produtos x inoculação x períodos de avaliação), exceto para rutina, um glicosídeo do flavonol quecetina.

Nas figuras 9 e 10 é apresentado o cromatograma evidenciando os compostos fenólicos e seus correspondentes espectros de absorção no ultravioleta, respectivamente. A amostra em questão foi composta por folhas de BRS 361 que receberam aplicação de jasmonato de metila + *Tween* 20 (JM + T20) e foram inoculadas com *P. pachyrhizi* coletadas 144 hai.

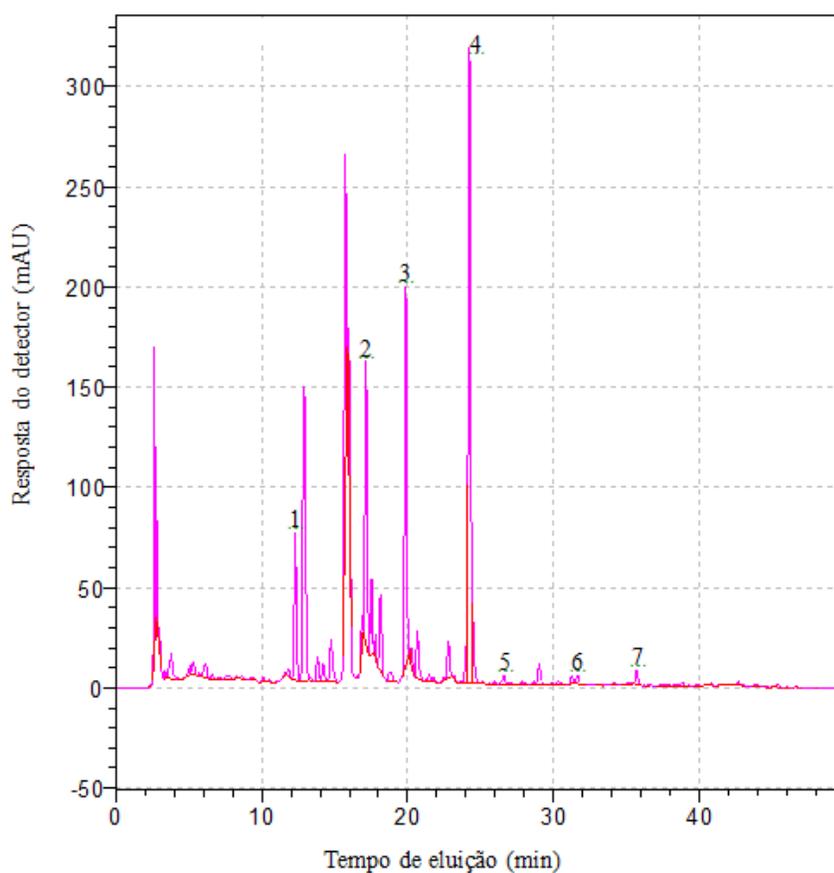


Figura 9 Cromatograma de uma amostra composta por folhas de BRS 361 que receberam aplicação de jasmonato de metila + *Tween* 20 e foram inoculada com *P. pachyrhizi* coletadas 144 hai. (1) daidzina, (2) genistina, (3) malonil daidzina, (4) malonil genistina, (5) daidzeína, (6) genisteína e (7) coumestrol

Nota: Tempo de retenção (TR).

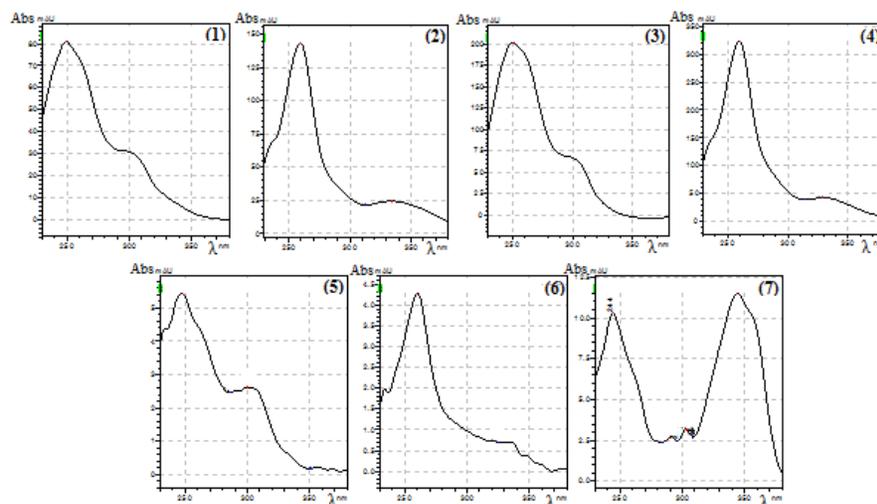


Figura 10 Espectros de absorção no ultra violeta de isoflavonoides relacionados a defesa a patógenos em soja. (1) daidzina: TR= 12,66, (2) genistina: TR=17,20, (3) malonil daidzina: TR= 19,55, (4) malonil genistina: TR= 24,56, (5) daidzeína: TR=26,34, (6) genisteína: TR= 29,35 e (7) coumestrol: TR= 36,24

Nota: Tempo de retenção (TR).

Os compostos daidzeína, daidzina, malonil daidzina e coumestrol não foram produzidos em quantidades significativas nas plantas pulverizadas apenas com água e não submetidas à inoculação (Tabela 1). A concentração destes isoflavonóides foi sempre superior nas plantas inoculadas com a ferrugem asiática, quando a avaliação ocorreu após 144 hai, indicando que a infecção com o *P. pachyrhizi* induz a síntese destes fenólicos em plantas de soja. Na forma aglicona daidzeína é um precursor de fitoalexinas como as gliceolinas e coumestrol. Essas substâncias de baixo peso molecular têm sido associadas à resistência da soja a doenças (GRAHAM, 1999; LOZOVAYA et al., 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com Lygin et al. (2009) que também observaram maior acúmulo dos isoflavonóides daidzeína e genisteína (agliconas) em dois genótipos de soja suscetíveis a *P. pachyrhizi* e

inoculados com o fungo. Segundo Rivera-Vargas et al. (1993), os compostos fenólicos, como a isoflavona genisteína que apresenta atividade antifúngica, podem ser induzidos em resposta à infecção, aumentando a resistência da soja a patógenos.

O aumento dos teores de isoflavonas está relacionado com a ativação da transcrição de genes envolvidos na rota de biossíntese de compostos fenólicos (WEISSHAAR; JENKINS, 1998). Van de Mortel et al. (2007) e Panthee et al. (2009) analisaram a expressão de genes em resposta à inoculação com *P. pachyrhizi* em diferentes genótipos de soja em diferentes estádios de crescimento e tempo de expressão. Nesses trabalhos eles verificaram que os genes da rota dos fenilpropanoides e biossíntese de parede celular são diferencialmente expressos em folhas inoculadas de genótipos suscetíveis e resistentes.

Van De Mortel et al. (2007) verificaram que no genótipo resistente, a maioria dos genes expressam mais rapidamente à infecção, iniciando 72 hai, enquanto no genótipo suscetível, a expressão permanece inalterada até 96 hai, período de tempo em que houve rápido crescimento do fungo. Segundo esses autores, a ferrugem asiática inicialmente induz uma resposta inespecífica que é transiente ou é suprimida quando os primeiros passos na colonização são concluídos em ambos os genótipos de soja. Esses resultados corroboram com os obtidos neste ensaio, no qual utilizamos um genótipo suscetível e a maior concentração dos compostos fenólicos induzidos ocorreu no período de 144 hai.

Resultados contrastantes são relatados por Graham et al. (1990) em plantas de soja infectadas com outro fungo, *Phytophthora megasperma*, que também infecta a soja. Nesse trabalho as concentrações da aglicona daidzeína e de gliceolinas aumentam mais rapidamente (até 48 hai), ao mesmo tempo em que conjugados de daidzina (açúcar, malonil e acetil) podem ou não diminuir.

Tabela 1 Concentração temporal de compostos fenólicos de folhas de soja (*Glycine max*) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*

Produtos	Inoculação	Período de avaliação (hai)		
		48	96	144

DAIDZEINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	0,00 Ac	0,73 Bb*	2,60 Aa*
	Não	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Tween 20	Sim	0,26 Ab	1,50 Aa*	0,18 Bb
	Não	0,05 Aa	0,07 Aa	0,00 Aa
Jasmonato de metila	Sim	0,00 Ab	0,69 Ba*	0,00 Bb
	Não	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa

GENISTEINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	0,32 Bc	1,11 Ab	2,44 Aa*
	Não	0,22 Bb	1,42 Aa	0,93 Aa
Tween 20	Sim	1,21 Aa	1,43 Aa*	0,89 Ba
	Não	0,84 Aa	0,79 Ba	0,54 Aba
Jasmonato de metila	Sim	0,70 Aba	1,21 Aa	1,01 Ba*
	Não	0,52 ABab	1,08 ABa	0,22 Bb

DAIDZINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	1,61 Bb	1,27 Bb	66,06 Aa*
	Não	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Aa
Tween 20	Sim	88,52 Aa*	35,41 Ab	19,79 Bb
	Não	21,34 Aa	25,29 Aa	17,43 Aa
Jasmonato de metila	Sim	9,68 Ba	26,87 Aa*	10,47 Ba
	Não	1,03 ABa	0,74 Ba	4,36 Aa

GENISTINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	56,21 Bb	47,35 Cb	72,98 Aa*
	Não	58,10 Aa	45,97 Ba	43,50 Ba
Tween 20	Sim	94,14 Aa*	62,32 Bb*	49,62 Bb
	Não	68,67 Aa	46,29 Bb	48,47 ABb
Jasmonato de metila	Sim	62,57 Bb	77,52 Aa	62,32 ABb
	Não	70,23 Aa	68,44 Aa	62,43 Aa

MALONIL DAIDZINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	36,80 Bb*	50,13 Bb*	260,08 Aa*
	Não	0,59 Ba	0,09 Ba	0,0 Ba
Tween 20	Sim	354,12 Aa*	96,53 Ab	84,79 Bb*
	Não	93,37 Aa	67,73 Aab	49,65 Ab
Jasmonato de metila	Sim	52,78 Ba	50,94 Ba	48,03 Ba
	Não	25,63 Ba	33,03 ABa	17,79 ABa

“Tabela 1, conclusão”

Produtos	Inoculação	Período de avaliação (hai)		
		48	96	144
MALONIL GENISTINA (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	87,24 Bb*	67,15 Bb*	145,91 Aa*
	Não	32,40 Ca	9,73 Ca	6,14 Ca
Tween 20	Sim	339,9 Aa*	102,73 Ab*	77,14 Bb
	Não	184,72 Aa	70,25 Bc	152,15 Ab*
Jasmonato de metila	Sim	79,86 Ba	74,31 ABa	71,31 Ba
	Não	66,25 Bb	120,42 Aa*	58,167 Bb
COUMESTROL (ng mg ⁻¹)				
Água	Sim	0,00 Bb	0,84 Bab*	1,15 Aa*
	Não	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
Tween 20	Sim	4,05 Aa*	3,73 Aa*	1,11 Ab
	Não	1,55 Aa	1,44 Aa	1,45 Aa
Jasmonato de metila	Sim	0,78 Ba	0,73 Ba	1,05 Aa
	Não	0,52 Ba	0,64 ABa	0,68 Aba

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), sendo que letras maiúsculas na coluna comparam os produtos dentro de cada período de avaliação e inoculação, e letras minúsculas na linha comparam os períodos de avaliação dentro de cada produto e inoculação. A presença de asteriscos indica que as médias inoculadas ou não diferiram entre si pelo teste de F ($p \leq 0,05$) dentro de cada produto e período de avaliação.

Como pode ser observado na tabela 1, a aplicação do surfactante *Tween* 20 promoveu o acúmulo de genistéina, daidzina, malonil daidzina, malonil genistéina e coumestrol. As concentrações destes compostos foram superiores nas plantas pulverizadas com este produto e não inoculadas, em comparação com plantas controle (aplicação de água). Para os compostos daidzina e malonil genistéina esse acúmulo foi maior apenas nos dois primeiros períodos de avaliação. Por outro lado, o aumento na concentração de malonil daidzina e coumestrol foi superior em todos os períodos, genistéina no período de 96 hai. Os compostos daidzéina e genistéina não foram influenciados pela aplicação apenas do *Tween* 20.

Corroborando os resultados obtidos neste ensaio, Graça (2012) também verificou que o *Tween* 20 desencadeou a produção dos compostos fenólicos

malonil daidzina, malonil genistina e coumestrol. Entretanto, em contradição aos resultados aqui obtidos, o composto daidzeína também aumentou com a aplicação de *Tween 20* (GRAÇA, 2012).

Nas plantas que receberam a aplicação de *Tween 20* e foram inoculadas houve maior acúmulo de daidzina, genistina, malonil daidzina, malonil genistina e coumestrol em relação às plantas que foram pulverizadas com água (Tabela 1). Para esses compostos o acúmulo foi significativo nos dois primeiros períodos de avaliação. Os compostos daidzeína e genisteína também aumentaram, mas apenas nos períodos de 96 hai e 48 hai, respectivamente.

No período de 144 hai, nas plantas inoculadas, a concentração de todos estes compostos foi superior nas plantas que foram pulverizadas com água em relação ao *Tween 20*, exceto para o coumestrol, que se observou diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas (Tabela 1). Esse resultado fornece indícios de que após a infecção com a ferrugem, o efeito do *Tween 20* na indução dos compostos observados é rápido, mas temporário.

O efeito indutor do *Tween 20* em alguns compostos fenólicos (Tabela 1), aliado ao aumento da atividade de enzimas de resposta de defesa (Figura 8) e a redução da severidade da ferrugem asiática (Figuras 6 e 7), comprovam o efeito eliciador do *Tween 20*, conforme discutido anteriormente no item 4.1. Desta forma, a indução de resistência de plantas de soja tratadas com *Tween 20* foi relacionada ao estímulo de substâncias do metabolismo secundário da planta e seu efeito na redução da severidade da ferrugem asiática, devido ao aumento da produção de compostos como genisteína e malonil genistina. Sendo assim, além da importância nos estudos biológicos como agente surfactante, o *Tween 20* pode exercer atividade elicitora de semioquímicos em folhas de plantas de soja, conforme também observado por Graça (2012). Ressalta-se a importância de verificação dos critérios metodológicos uma vez que o composto *Tween 20* utilizado como surfactante para o eliciador jasmonato de metila também

funciona como eliciador. E que muitas respostas observadas e atribuídas a efeitos exclusivos do jasmonato de metila podem estar superestimadas pelo efeito exercido pelo próprio surfactante.

Nas plantas não inoculadas, o JM + T20 aumentou a concentração de daidzeína, genisteína, daidzina, malonil daidzina e coumestrol (Tabela 1). No período de 96 hai, nas plantas não inoculadas o jasmonato de metila promoveu o maior acúmulo de genistina em relação ao *Tween* 20 e a água. Para a malonil genistina nos demais períodos o efeito foi menor que o de *Tween* 20, porém maior que a água, enquanto que para a genistina os produtos não diferiram nos demais períodos.

Em soja, os jasmonatos são apontados como potencializadores do acúmulo da isoflavona genistina (GRAHAM; GRAHAM, 1991), conforme também observado no presente trabalho. Corroborando com os resultados obtidos neste ensaio, a aplicação de JM + T20 em plantas de soja induziu a síntese de daidzeína e genisteína (MA; ZHAO, 2011). Segundo Graham (1999), os compostos daidzeína e genisteína, bem como os seus conjugados, desempenham múltiplos papéis na defesa da soja, sendo inclusive diretamente tóxicos para alguns patógenos, como *Phytophthora sojae*.

A indução sistêmica em soja foi também observada por Park et al. (2002), que, avaliando os efeitos de jasmonatos e outros indutores químicos, observaram indução de daidzeína e genisteína em tecidos distantes do ponto de indução. Como alguns genes que codificam para compostos de defesa estão sob controle da rota do jasmonato (TURNER et al., 2002), a pulverização com JM + T20 pode ter desencadeado a síntese dos isoflavonoides como resposta de defesa da soja.

Após 144 hai a concentração dos compostos malonil genistina, daidzeína, genisteína, malonil daidzina foram superiores nas plantas pulverizadas com água em relação aos demais produtos (Tabela 1). Com estes

resultados pode-se ressaltar que a ferrugem é o fator que mais influencia no acúmulo destes compostos, conforme discutido anteriormente.

O *Tween 20* promoveu o maior aumento do coumestrol nos períodos de 48 e 96 hai e da daidzeína no período de 96 hai, em relação aos demais produtos (Tabela 1), comprovando o seu efeito elicitor. Em plantas inoculadas, no período de 96 hai, o jasmonato induziu o acúmulo de genistina em relação ao *Tween 20* e à água. No entanto, no período de 48 hai, o *Tween 20* promoveu o maior acúmulo em relação aos demais produtos.

A concentração de rutina apresentou um comportamento distinto dos demais compostos fenólicos (Tabela 2). No desdobramento da interação entre produtos e período de avaliação, pode-se observar que somente no período de 48 hai foram observadas diferenças significativas entre os produtos aplicados, sendo que o *Tween 20* reduziu a concentração de rutina em relação aos demais produtos. Através do desdobramento da interação entre inoculação e período de avaliação, pode-se verificar que a concentração de rutina no período de 48 hai e 144 hai foi menor nas plantas que foram inoculadas em comparação com as não inoculadas. Nas plantas inoculadas não foram observadas diferenças entre os produtos aplicados, enquanto nas não inoculadas o *Tween 20* reduziu a concentração de rutina em relação à água e ao jasmonato de metila + *Tween 20* (JM + T20) (Desdobramento da interação entre inoculação e produtos).

Tabela 2 Concentração temporal de rutina em folhas de soja (*Glycine max*) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*

Produtos	Período de avaliação (hai)		
	48	96	144
Água	43,84 Aa	28,60 Ab	25,63 Ab
Tween 20	21,97 Ba	19,20 Aa	23,44 Aa
Jasmonato de metila	38,51 Aa	23,55 Ab	33,03 Aab
Inoculação			
Sim	27,02 Ba	20,60 Aab	16,55 Bb
Não	42,53 Aa	26,97 Ab	38,17 Aa
Inoculação			
Inoculação	Produtos		
	Água	Tween 20	Jasmonato de Metila
Sim	22,05 Ba	18,8 Aa	23,32 Ba
Não	43,33 Aa	24,27 Ab	40,07 Aa

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). No desdobramento das interações entre produtos e período de avaliação, letras maiúsculas comparam produtos dentro de cada período de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam períodos de avaliação dentro de cada produto aplicado. No desdobramento da interação entre inoculação e período de avaliação, letras maiúsculas comparam inoculação dentro de cada período de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam períodos de avaliação dentro da presença ou ausência de inoculação. No desdobramento da interação entre inoculação e produtos, letras maiúsculas comparam inoculação dentro de cada produto, enquanto letras minúsculas comparam produtos dentro da presença ou ausência de inoculação.

A rutina é conhecida por atuar negativamente no desenvolvimento e biologia de lagartas como *Anticarsia gemmatalis* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006), *Pseudoplusia includens* (ROSE; SPARKS; SMITH, 1988) e *Trichoplusia ni* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Dentre as formas de atuação é evidenciado que este composto pode induzir a hidrólise de fosfolipídios das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares (GAZZONI et al., 1997).

No entanto, são escassos relatos da relação da rutina em infecções fúngicas. No trabalho de Lagrange, Jay-Allgmand e Lapeyrie (2001) a atividade deste flavonol foi testada em variedades de fungos micorrízicos e saprófitas, no qual eles observaram que este composto promove o crescimento das hifas de *Pisolithus tinctorius*.

Ao se analisar a rota de biossíntese da rutina, verifica-se que a naringenina é o precursor comum para a síntese deste flavonol e da isoflavona genisteína (DHAUBHADEL, 2011). No presente trabalho, a genisteína aumentou com a inoculação, assim como com a aplicação do *Tween 20* e JM + T20, enquanto a rutina reduziu com a inoculação e também com a aplicação do *Tween 20*. Possivelmente, a relação inversa entre estes dois compostos pode estar relacionada com desvio de rota na utilização de esqueletos de carbono para a biossíntese.

Corroborando com os resultados obtidos neste ensaio, Graça (2012) também verificou redução da rutina nos mesmos períodos após aplicação do *Tween 20*. Entretanto a redução da concentração desse composto devido à aplicação de *cis*-jasmone (GRAÇA, 2012) é discrepante ao ocorrido neste trabalho onde a concentração permaneceu constante após a aplicação de JM + T20.

A redução da rutina em plantas inoculadas também pode ser explicado pelo desvio da rota para a biossíntese de genisteína, uma vez que este composto aumentou em plantas inoculadas, conforme pôde ser evidenciado na tabela 1.

Esperava-se que *Phakopsora pachyrhizi* ativasse a rota de defesa relacionada com o ácido salicílico por se tratar de um fungo biotrófico (BARI; JONES, 2009). Entretanto, ocorre o envolvimento predominante de ácido jasmônico durante as fases iniciais da ferrugem asiática imitando um fungo necrotrófico (LOEHRER et al., 2008). Sendo assim, a baixa concentração de rutina nas plantas inoculadas com ferrugem asiática neste trabalho fornece

subsídio para esta discussão, uma vez que Sun et al. (2012) observaram que a rotina foi aumentada após a aplicação de ácido salicílico.

4.4 Avaliações de trocas gasosas

Com os resultados das análises de variância das trocas gasosas e pigmentos clorofilianos, podem se observar que tais variáveis analisadas apresentaram comportamento distinto em relação aos fatores estudados (APÊNDICE B). A taxa fotossintética não foi influenciada pelos produtos aplicados, no entanto, variou devido à inoculação com o patógeno da ferrugem asiática e com o tempo decorrido após a inoculação (período de avaliação), bem como pela interação entre estes fatores. Os pigmentos clorofilianos foram influenciados pela inoculação e período de avaliação isoladamente e pela interação entre os produtos aplicados e a inoculação.

A condutância estomática foi influenciada por todos os fatores estudados de maneira isolada e pelas interações duplas entre eles, ou seja, produto x inoculação, tratamento x data de coleta e inoculação x data de coleta (APÊNDICE B). A concentração intracelular de CO₂ variou de acordo com o tempo decorrido após a inoculação, bem como pela interação entre os produtos aplicados com a inoculação e com os períodos de avaliação.

A taxa de transpiração foi influenciada por todos os fatores estudados de maneira isolada e pelas interações entre eles (APÊNDICE B). A temperatura foliar variou de maneira semelhante ao observado para a taxa de transpiração, exceto pela interação entre produtos aplicados e inoculação, que não foi significativa.

A eficiência de carboxilação variou com a inoculação e período. A eficiência instantânea do uso da água foi influenciada apenas pelo período de

avaliação e pela interação entre inoculação e período. A razão entre concentrações de CO₂ intra/extracelular variou apenas com o período.

A inoculação com o patógeno da ferrugem asiática proporcionou redução na taxa fotossintética das plantas de soja, em todos os períodos avaliados (Figura 11). Embora, não tenham sido encontrados na literatura trabalhos que tratem especificamente do efeito da ferrugem asiática da soja sobre as trocas gasosas, estudos com outros patossistemas têm comprovado a redução na taxa fotossintética sob infecções fúngicas (BASTIAANS, 1991; SCHARTE et al., 2005; SWARBRICK et al., 2006).

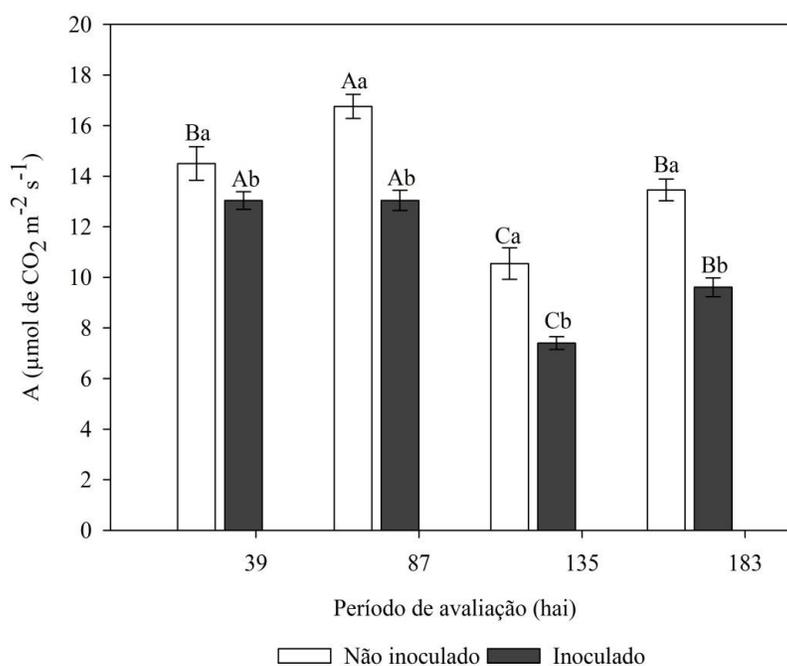


Figura 11 Taxa fotossintética (A) em folhas de soja após inoculação com *Phakopsora pachyrhizi* e no controle (não inoculado)

Nota: A barra de erro da figura corresponde ao erro padrão da média de 18 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), sendo que letras minúsculas comparam as inoculações dentro de cada período de avaliação, e letras maiúsculas comparam períodos dentro de inoculação.

Poderia se inferir que a redução da taxa fotossintética nas plantas infectadas com a ferrugem asiática foi devido à destruição dos tecidos foliares que acarretaria em amarelecimento e desfolha prematura com o avanço da doença (ANDRADE; ANDRADE, 2002). No entanto, durante o período avaliado, não foram observadas alterações visuais significativas e nem abscisão no limbo foliar. Segundo Goellner et al. (2010), os sintomas visuais iniciam entre cinco a oito dias após a inoculação.

A explicação mais provável então para a redução na taxa fotossintética das plantas infectadas com a ferrugem asiática é a ocorrência de algum dano no aparato fotossintético, provavelmente porque alterações metabólicas precedem alterações visuais. Segundo Bastiaans (1991), a brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, reduziu a fotossíntese não só devido à diminuição da área fotossinteticamente ativa, mas também através de um efeito na fotossíntese do tecido foliar verde remanescente.

Estresses bióticos e ou abióticos resultam em aumento na energia de excitação, o que excede a quantidade requerida ao metabolismo fotossintético (ASADA, 1999). O excesso da energia de excitação é altamente prejudicial às plantas, levando à destruição dos centros de reação dos fotossistemas e a danos oxidativos (MATEO et al., 2004).

Berger et al. (2007) propuseram que as plantas reprimem a fotossíntese e a assimilação para aumentar a respiração e outros processos necessários à defesa. No entanto, a interação com patógenos aumenta a demanda por assimilados na planta, uma vez que indução da defesa é dispendiosa (HEIL; BOSTOCK, 2002; SWARBRICK et al., 2006) e muitos agentes patogênicos tentam manipular o metabolismo de carboidratos da planta para sua própria necessidade (BERGER et al., 2007).

A taxa fotossintética variou com o período de avaliação tanto em plantas inoculadas como não inoculadas, contudo, de maneira distinta (Figura 11). Nas

plantas não inoculadas a taxa fotossintética foi superior no período de 87 hai, seguido de 39 e 183 hai, que não variaram entre si. Para estas plantas, no período de 135 hai, foi observada a menor taxa fotossintética. É natural que as plantas apresentem pequenas variações nas trocas gasosas ao longo do tempo, mesmo que não submetidas a nenhum tratamento (Figura 4). Este parâmetro fisiológico é muito influenciado por pequenas variações nas condições do ambiente, o que pode ser observado mesmo quando as plantas estão sendo cultivadas em condições controladas.

Nas plantas inoculadas a taxa fotossintética decresceu nos dois últimos períodos avaliados, sendo menor no período de 135 hai em relação a 183 hai. Este declínio, evidenciado nos últimos períodos avaliados, provavelmente foi acarretado pelo avanço da infecção.

Embora a taxa fotossintética não tenha sido influenciada pelos produtos aplicados, em diversos trabalhos tem sido evidenciado que a aplicação de jasmonato de metila causa declínio na atividade fotossintética (HRISTOVA; POPOVA, 2002; ROSSATO et al., 2002; NAYYAR; GUPTA, 2006). Cheong e Choi (2003) relataram que os genes envolvidos na fotossíntese são reprimidos pela ação do jasmonato de metila, como no caso da ribulose difosfato carboxilase/oxigenase, proteína de ligação clorofila a/b, e captador de luz do complexo II. No entanto, esse composto promoveu aumento na taxa fotossintética em plantas de artemísia (AFTAB et al., 2011).

A inoculação acarretou em redução no teor de pigmentos clorofilianos nas plantas que foram pulverizadas com JM + T20 e *Tween* 20 (Figura 12 A). Até o período avaliado apenas a inoculação com o patógeno não alterou a concentração dos pigmentos. Este fato está de acordo com o observado visualmente, uma vez que durante o período de avaliação não foram evidenciados amarelecimento significativo do limbo. Com estes resultados pode-

se concluir que a aplicação dos produtos agravou o efeito da inoculação sobre os pigmentos fotossintéticos.

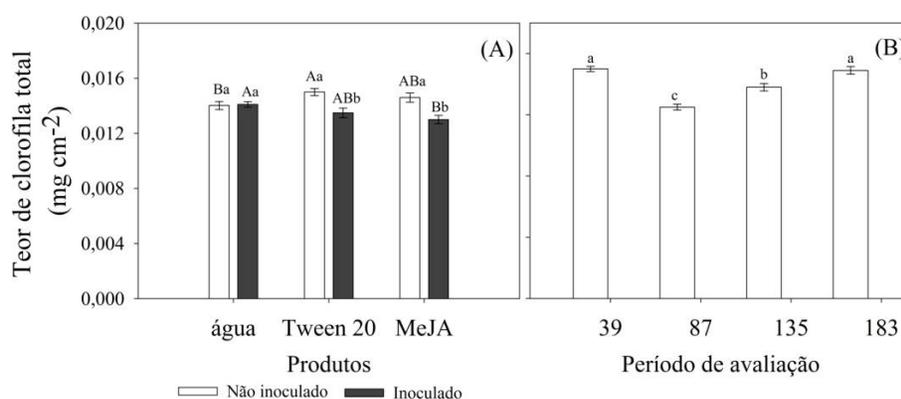


Figura 12 (A) Teor de clorofila em folhas de soja inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi* e submetidas a aplicação foliar de água, Tween 20 e jasmonato de metila; (B) Concentração temporal de pigmentos clorofilianos

Nota: A barra da figura A corresponde ao erro padrão da média de 24 repetições e da figura B de 36 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a figura A, letras minúsculas comparam as inoculações dentro de cada produto, e letras maiúsculas comparam produtos dentro de inoculação.

Nas plantas não inoculadas o maior acúmulo de pigmentos clorofilianos foi obtido após a pulverização com o Tween 20 em comparação com a água. No entanto, o JM + T20 não diferiu dos demais tratamentos (Figura 12 A). Por outro lado, nas plantas inoculadas, o JM + T20 promoveu redução no teor de pigmentos clorofilianos em relação à água, contudo, o Tween 20 não diferiu dos demais tratamentos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliem a influência do Tween 20 no acúmulo de pigmentos fotossintéticos. Por outro lado, corroborando os resultados obtidos neste ensaio, diversos autores têm demonstrado que a aplicação de jasmonato de metila reduz o teor de clorofila em

plantas de soja (ANJUM et al., 2011), em canola (ROSSATO et al., 2002) e em *Arabidopsis* (JUNG, 2004). No entanto, ao contrário do que ocorreu neste trabalho, o jasmonato de metila promoveu aumento no teor de clorofila total em artemísia (AFTAB et al., 2011).

O teor de pigmentos clorofilianos também variou em função do período de avaliação (Figura 12 B). Foi observada uma redução após 87 hai, um breve aumento no período seguinte (135 hai), e o maior conteúdo no último período de avaliação, que não diferiu do primeiro. Estas alterações no teor de pigmentos ao longo do tempo também podem ser explicadas, conforme relatado para a taxa fotossintética, em função de pequenas variações no ambiente de cultivo.

A inoculação promoveu redução na condutância estomática em todos os períodos avaliados, exceto no primeiro período, que não diferiu (Figura 13 A) e independente dos produtos aplicados (Figura 13 B).

Conforme discutido anteriormente, em situações de estresses ambientais ocorre um aumento na energia de excitação, que excede a quantidade requerida no metabolismo fotossintético (ASADA, 1999). O aumento na energia de excitação tem sido associado com redução na assimilação do CO₂ causado pelo decréscimo na condutância estomática e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (MATEO et al., 2004). As espécies reativas de oxigênio induzem o fechamento estomático (MUNEMASA et al., 2007), mecanismo que pode explicar a redução na condutância.

Estudos da interação entre *P. pachyrhizi* e *Arabidopsis*, planta não-hospedeira, comprovaram que espécies não-transformadas desta planta infectadas por este fungo acumulam peróxido de hidrogênio (LOEHRER et al., 2008), que pode ter acarretado em fechamento estomático no presente ensaio.

O fechamento estomático acarreta decréscimo no influxo de CO₂, embora também resultem em menores perdas de vapor de água via transpiração. Em situações de estresses bióticos este fato poderia ser muito prejudicial às

plantas, uma vez que além do aumento da demanda por assimilados para a resposta de defesa, ainda existe um dreno extra que são os agentes patogênicos (BERGER et al., 2007).

No entanto, o fechamento estomático sob estresse biótico, como infecção fúngica, é uma estratégia que as plantas utilizam para evitar a penetração dos agentes patogênicos através dos estômatos (GUDESBLAT; TORRES; VOJNO, 2009). Portanto, poderia ser uma estratégia vantajosa, uma vez que a maioria dos agentes etiológicos de ferrugens utiliza os estômatos para iniciar o processo infeccioso em tecidos de hospedeiros suscetíveis (FERREIRA, 1989). No caso da ferrugem asiática da soja causada por *P. pachyrhizi* esta estratégia não é eficiente, uma vez que sua penetração ocorre de forma direta pela epiderme intacta (ZAMBOLIN, 2006; GOELLNER et al., 2010), e, de forma menos frequente, sob células guarda do estômato não sendo observada a formação de apressórios (ZAMBENEDETTI-MAGNANI; ALVES; ARAÚJO, 2007).

Além disso, a redução na condutância estomática interfere na cadeia de transferência de elétrons e reduz a entrada de CO₂ nos cloroplastos durante o ciclo de Calvin (CURVÊLO et al., 2013). Com isso, haverá excesso de NADPH e os elétrons originários da quebra da molécula de água no fotossistema II não terão NADP⁺ disponível para reduzi-lo. Assim, haverá um forte aumento na quantidade de elétrons que, por sua vez, provocarão foto-oxidação da clorofila nas antenas do fotossistema (BACELAR et al., 2006), o que pode explicar a redução nos pigmentos clorofilianos observada neste ensaio (Figura 12 A).

O período de avaliação influenciou na condutância estomática de maneira distinta em plantas submetidas ou não à inoculação (Figura 13 A). Nas plantas que não foram inoculadas a condutância estomática foi superior a 135 hai e não diferiu nos demais. Entretanto, nas plantas inoculadas, a maior condutância estomática foi observada apenas no primeiro período, reduzindo nos

demais, que não diferiram entre si. Provavelmente, essa redução ao longo do tempo também ocorreu devido ao avanço da doença.

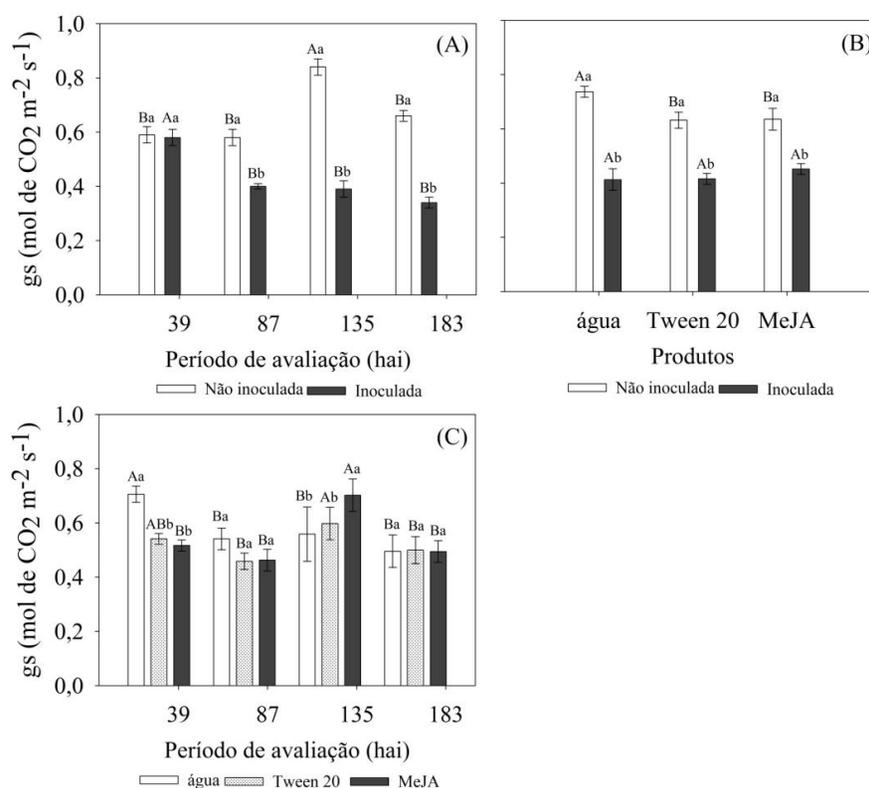


Figura 13 (A) condutância estomática (gs) em folhas de soja inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*; (B) condutância estomática (gs) em folhas de soja inoculadas ou não *Phakopsora pachyrhizi* que receberam aplicação foliar de água, Tween 20 e jasmonato de metila; (C) condutância estomática temporal em soja que receberam aplicação de diferentes produtos

Nota: A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 18, 24 e 12 repetições, respectivamente para as figuras A, B e C. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a figura A letras minúsculas comparam as inoculações dentro de cada período de avaliação, e letras maiúsculas comparam os períodos dentro de inoculação. Para a figura B, letras minúsculas comparam inoculação dentro dos produtos, e letras maiúsculas comparam produtos dentro de inoculação. Para a figura C, letras minúsculas comparam períodos dentro dos produtos, e letras maiúsculas comparam produtos dentro de período.

A aplicação de *Tween* 20 e JM + T20 promoveu redução na condutância estomática nas plantas que não foram inoculadas (Figura 13 B). Diversos trabalhos relatam que o jasmonato de metila provoca fechamento estomático em várias espécies vegetais, de maneira semelhante ao ABA (MUNEMASA et al., 2007; SAITO et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliem a influência do *Tween* 20 no fechamento estomático.

Nas plantas pulverizadas com água a condutância estomática foi superior no primeiro período avaliado, decaindo nos demais (Figura 13 C). Com o *Tween* 20 e o JM + T20 o maior valor foi obtido no período de 135 hai, reduzindo nos demais.

O JM + T20 e o *Tween* 20 promoveram redução da condutância estomática no período de 39 hai (Figura 13 C). No entanto, no período de 135 hai o jasmonato de metila + *Tween* 20 promoveu aumento na condutância estomática, embora este resultado tenha sido contrário ao observado na figura 13 B. Na maioria dos trabalhos é evidenciado que a aplicação de jasmonato de metila induz o fechamento estomático, conforme discutido anteriormente, embora, em plantas de artemísia tenha sido observado aumento deste parâmetro fisiológico (AFTAB et al., 2011).

A concentração intracelular de CO₂ (Ci) não foi influenciada pelos produtos nos dois primeiros períodos avaliados (Figura 14). O JM + T20 e o *Tween* 20 promoveram aumento no valor de Ci no período de 135 hai. O aumento na concentração intracelular de CO₂, proporcionado pela aplicação de JM + T20 neste período, foi acompanhado pelo aumento da condutância estomática (Figura 13 C). No período de 183 hai o JM + T20 promoveu o maior valor de concentração intracelular de CO₂ e o *Tween* 20 o menor, contudo, não foram observadas diferenças significativas na condutância estomática.

O aumento na concentração intracelular de CO₂ acompanhado do fechamento estomático pode ser um indicativo de que outros processos fisiológicos podem estar contribuindo para o aumento, como por exemplo uma maior atividade respiratória. Embora o valor de Ci não tenha sido influenciado pela inoculação, é relatado que a atividade metabólica das células da folha aumenta a partir do momento da infecção, a qual é geralmente seguida por um aumento na frequência respiratória (BASSANEZI et al., 2001).

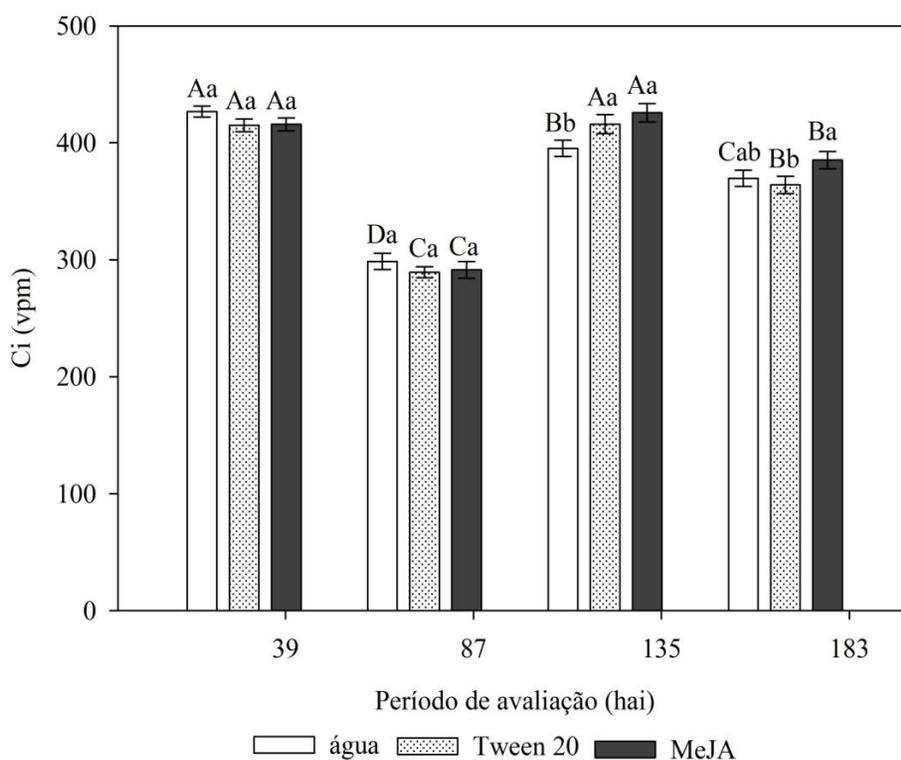


Figura 14 Avaliação temporal da concentração intracelular de CO₂ (Ci) em plantas de soja que receberam aplicação de diferentes produtos: água, Tween 20 e jasmonato de metila

Nota: A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 12 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), sendo que letras maiúsculas comparam períodos de avaliação dentro de cada produto e letras minúsculas comparam produtos dentro de cada período.

Corroborando os resultados obtidos neste trabalho, a aplicação de jasmonato de metila aumentou a concentração interna de CO₂ em plantas de artemísia (AFTAB et al., 2011). Entretanto, resultados contrários foram obtidos em soja por Anjum et al. (2011), que verificaram que a aplicação de jasmonato de metila reduziu a concentração intercelular de CO₂.

Independentemente do produto aplicado, a inoculação promoveu redução na taxa transpiratória em todos os períodos avaliados, exceto a 39 hai (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a condutância estomática (Figura 13 A), uma vez que o fechamento dos estômatos ocasionou menores perdas de vapor d'água via transpiração, embora possa ter ocasionado menor influxo de CO₂.

Segundo Bassanezi et al. (2001), o decréscimo na taxa de transpiração pode ser consequência, além do fechamento estomático, da redução no volume de ar contido nos tecidos vegetais (resultante da presença de hifas), bem como da hipertrofia dos tecidos do mesofilo. Segundo Curvêlo et al. (2013) em algodoeiro infectado pelo fungo *Ramularia areola*, a redução na transpiração possivelmente está relacionada à destruição da cutícula e dos estômatos e com o rompimento do limbo foliar, o que afeta diretamente a condutância estomática.

Tabela 3 Transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em folhas de soja (*Glycine max*) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*

Produtos	Inoculação	Período de avaliação (hai)			
		39	87	135	183
Água	Sim	2,24 Aa	1,80 Bb	1,25 Bc	1,34 Ac
	Não	2,15 Ab	2,68 Aa*	1,99 Ab*	2,10 Ab*
Tween 20	Sim	2,23 Aa	1,86 ABb	1,68 Ab	1,36 Ac
	Não	2,13 Ab	2,63 Aa*	2,02 Ab*	2,09 Ab*
Jasmonato de metila	Sim	2,26 Aa	2,02 Ab	1,77 Ac	1,37 Ad
	Não	2,18 Ab	2,62 Aa*	2,06 Ab*	2,12 Ab*

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), sendo que letras maiúsculas na coluna comparam os produtos dentro de cada período de avaliação e inoculação, e letras minúsculas na linha comparam os períodos de avaliação dentro de cada produto e inoculação. A presença de asteriscos indica que as médias inoculadas ou não diferiram entre si pelo teste de F ($p \leq 0,05$) dentro de cada produto e período de avaliação.

Dependendo do modo de infecção, a taxa de transpiração pode aumentar ou diminuir (OKORSKI et al., 2008). Em plantas atacadas por agentes patogênicos biotróficos tem sido observado aumento na transpiração (MAYER; STAPLES; GIL-AD, 2001). Por outro lado, fatores patogênicos necrotróficos podem causar fechamento dos estômatos, mesmo se a severidade da doença for baixa (MAYER; STAPLES; GIL-AD, 2001), o que por sua vez diminui a taxa de transpiração (OKORSKI et al., 2008).

O patógeno causador da ferrugem asiática apresenta característica de fungo necrotrófico nas etapas iniciais de infecção e, quando atinge a camada foliar do mesófilo, passa a comportar-se como patógeno biotrófico por meio da formação de haustórios (LOEHRER et al., 2008). É possível que o comportamento do patógeno tenha sido responsável pelo fechamento estomático e a conseqüente redução na transpiração.

Em todas as plantas inoculadas, observou-se redução na taxa transpiratória ao longo do período avaliado, com pequenas variações entre os produtos aplicados. Nas plantas não inoculadas a taxa transpiratória foi superior no período de 87 hai independente do produto aplicado. Provavelmente este

aumento foi acarretado por alguma pequena variação no ambiente uma vez que não houve diferença entre os produtos aplicados (Tabela 3).

Nas plantas não inoculadas não foram observadas diferenças entre os produtos aplicados em todos os períodos de avaliação (Tabela 3). Estes resultados são discordantes aos obtidos por Anjum et al. (2011), que verificaram que a aplicação de jasmonato de metila em soja reduz a transpiração.

Nas plantas inoculadas somente nos períodos de 87 e 135 hai foram observadas diferenças entre os produtos aplicados (Tabela 3). Nestes períodos o JM + T20 promoveu aumento na transpiração em relação à água. No período de 135 hai o *Tween 20* também promoveu aumento na transpiração em relação à água, contudo não diferiu do JM + T20.

No período de 135 hai a aplicação de jasmonato de metila promoveu aumento na condutância estomática (Figura 13 C), que foi acompanhado pelo aumento na concentração intracelular de CO₂ (Figura 14). Possivelmente, o aumento na transpiração neste período foi devido ao aumento na condutância estomática.

Independente do produto aplicado, em todos os períodos avaliados, a inoculação promoveu aumento na temperatura foliar, exceto no período de 97 hai, quando nas plantas não inoculadas foi superior (Tabela 4). Embora a temperatura foliar não tenha sido significativamente afetada pela doença causada por molicutes no milho, Magalhães et al. (2001) relataram que reduções na taxa de transpiração podem causar aumento na temperatura da folha, uma vez que o resfriamento foliar se torna mais limitado. Este fato pode explicar o aumento na temperatura foliar, pois a inoculação promoveu redução na taxa transpiratória (Tabela 3).

Tabela 4 Temperatura foliar de soja (*Glycine max*) submetidas a aplicação de diferentes produtos e inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*

Produtos	Inoculação	Período de avaliação (hai)			
		39	87	135	183
Água	Sim	25,84 Ba*	24,33 Bb	24,70 Ab*	25,47 Aa*
	Não	25,28 Ba	25,05 Ba*	23,15 Ac	24,55 Bb
Tween 20	Sim	26,32 Aa*	25,02 Ac	24,00 Bd*	25,70 Ab*
	Não	25,73 Aa	25,38 ABa*	23,35 Ac	24,77 ABb
Jasmonato de metila	Sim	26,55 Aa*	25,08 Ac	24,05 Bd*	25,58 Ab*
	Não	25,90 Aa	25,47 Aab*	23,35 Ac	25,03 Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), sendo que letras maiúsculas na coluna comparam os produtos dentro de cada período de avaliação e inoculação, e letras minúsculas na linha comparam os períodos de avaliação dentro de cada produto e inoculação. A presença de asteriscos indica que as médias inoculadas ou não diferiram entre si pelo teste de F ($p \leq 0,05$) dentro de cada produto e período de avaliação.

Nas plantas não inoculadas, para todos os produtos aplicados, foi observada redução na temperatura foliar nos períodos de 135 e 183 hai, com menor valor a 135 hai (Tabela 4). Nas plantas inoculadas e pulverizadas com água foi observada redução na temperatura foliar nos períodos de 87 e 135 hai.

A aplicação do Tween 20 e do JM + T20 e posterior inoculação promoveram redução na temperatura foliar ao longo do período de avaliação, com maior valor no período de 39 hai, seguido de 183, 87 e 135 hai (Tabela 4). Nas plantas inoculadas a aplicação de JM + T20 promoveu aumento na condutância estomática (Figura 13 C), que foi acompanhado pelo aumento da concentração intracelular de CO₂ (Figura 14) e aumento na transpiração (Tabela 3). Provavelmente a redução da temperatura foliar foi devida ao aumento da condutância estomática e consequentemente da transpiração.

Nos períodos de 39 e 87 hai nas plantas inoculadas, o Tween 20 e o JM + T20 promoveram aumento na temperatura foliar, enquanto no período de 135 hai acarretaram em redução (Tabela 4). Nas plantas que não foram inoculadas, no período de 39 hai, o Tween 20 e o JM + T20 promoveram aumento na

temperatura foliar. Nos períodos de 87 e 135 hai este comportamento foi mantido, exceto pelo *Tween 20* que não diferiu dos demais produtos.

A inoculação promoveu redução na eficiência de carboxilação (Figura 15 A). No período de 87 hai foi obtido o maior valor de eficiência de carboxilação, seguido de 39 e 183 hai, que não diferiram entre si. O menor valor foi obtido no período de 135 hai. A redução na eficiência da carboxilação foi determinada pelas taxas fotossintéticas (Figura 11) em plantas inoculadas uma vez que a concentração interna de carbono (Figura 14) não foi influenciada pelo patógeno. Como a redução na fotossíntese não foi acompanhada pelo aumento de C_i , pode-se sugerir que a assimilação decrescente não é unicamente devida à diminuição na transferência de CO_2 a partir da atmosfera, podendo ser devida à redução da eficiência de carboxilação, o que evidencia que a queda na fotossíntese foi devida a danos no aparato fotossintético, conforme discutido anteriormente.

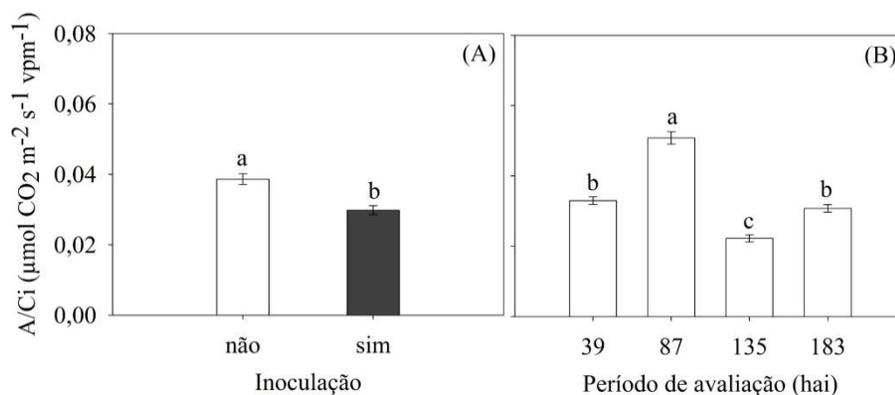


Figura 15 Eficiência de carboxilação (A/C_i) em plantas de soja. (A) plantas inoculadas e não com *Phakopsora pachyrhizi*, (B) em diferentes períodos de avaliação

Nota: A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 72 e 36 repetições, respectivamente para as figuras A e B. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A eficiência instantânea do uso da água foi inferior nas plantas que foram inoculadas no período de 39 e 135 hai (Figura 16). Entretanto, no período de 87 hai, este resultado foi invertido. Nas plantas não inoculadas a eficiência do uso da água foi menor apenas no período de 135 hai. A redução da eficiência neste período provavelmente foi devido ao aumento da transpiração (Tabela 3) acarretado pelo aumento na condutância estomática (Figura 13 A).

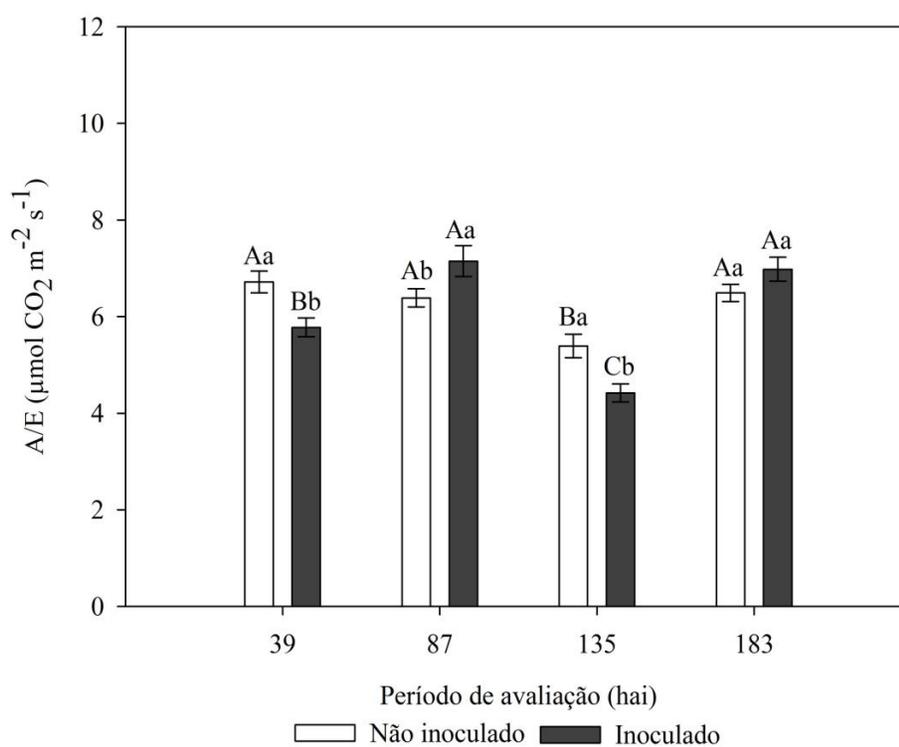


Figura 16 Eficiência instantânea do uso da água (A/E) em plantas de soja inoculadas e não com *Phakopsora pachyrhiz* em diferentes períodos de avaliação

Nota: A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 18 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam as inoculações dentro de cada período de avaliação, e letras maiúsculas comparam os períodos dentro de inoculação.

Somente foram observadas diferenças na razão entre concentração interna e ambiente de CO₂ com o período de avaliação, sendo o maior valor observado no período de 135 hai, seguido de 39 e 183 hai, que não diferiram entre si (Figura 17). O menor valor foi obtido no período de 87 hai.

Provavelmente, o aumento da relação no período de 135 hai (Figura 17) foi devido ao aumento na condutância estomática que ocorreu devido aplicação de *Tween 20* e *JM + T20* neste mesmo período (Figura 13 B), que acarretou em aumento no valor de Ci (Figura 14) e transpiração (Tabela 3) e redução na temperatura da folha (Tabela 4).

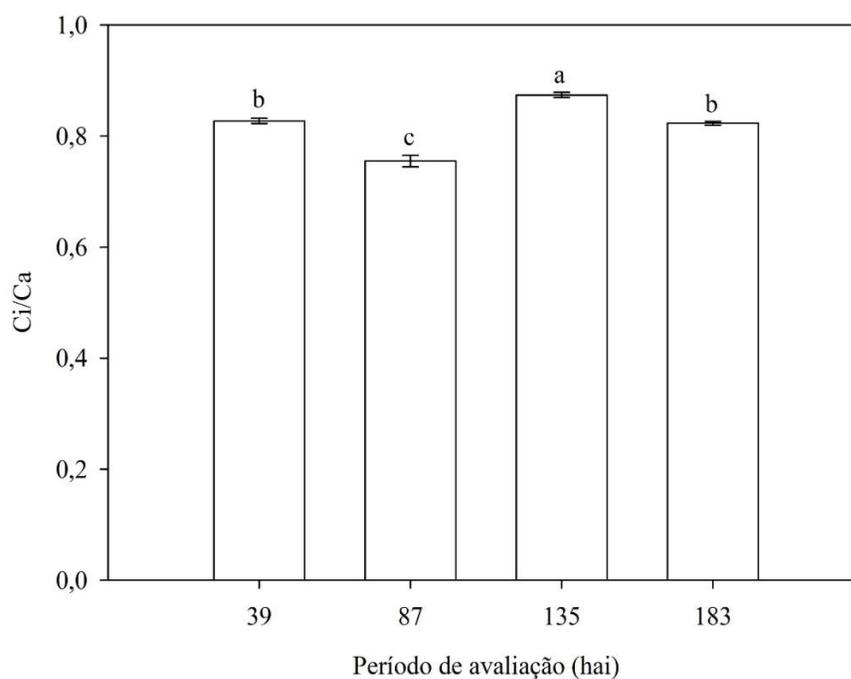


Figura 17 Razão entre concentrações de CO₂ intra/extracelular (Ci/Ca) em plantas de soja inoculadas e não com *Phakopsora pachyrhiz* em diferentes períodos de avaliação

Nota: A barra da figura corresponde ao erro padrão da média de 18 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam as inoculações dentro de cada período de avaliação, e letras maiúsculas comparam os períodos dentro de inoculação.

Embora a razão entre concentração interna e ambiente de CO₂ não tenha sido influenciada nem pelos produtos aplicados e nem pela inoculação com o patógeno da ferrugem asiática. Curvêlo et al. (2013) relataram que a infecção pelo fungo *R. aréola* afetou negativamente a razão entre concentração interna e ambiente de CO₂ em plantas de algodoeiro.

5 CONCLUSÃO

A inoculação com *Phakopsora pachyrhizi* promoveu aumento na atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase, na qualidade e quantidade dos compostos fenólicos. Redução na eficiência fotossintética expressada pela redução dos parâmetros ecofisiológicos.

Jasmonato de metila + *Tween* 20 e *Tween* 20 podem ser considerados compostos indutores de resistência à ferrugem asiática em soja. Sendo que a associação deste dois compostos (JM + T20) podem intensificar as respostas de resistência ao patógeno.

A indução de resistência promovida por estes compostos pode ser correlacionada com atividade da quitinase e β -1,3-glucanase e alteração quantitativa e qualitativa no perfil dos compostos fenólicos.

Aplicação de jasmonato de metila e *Tween* 20 intensificou o efeito negativo da inoculação na condutância estomática e transpiração, sem contudo alterar a fotossíntese.

REFERÊNCIAS

- AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in artemisia annua L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 425-435, Dec. 2011.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th. ed. San Diego: San Diego Academic Press, 2005.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.569-588.
- ALMEIDA, H. O. et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2012.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. A. A. **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2002. (Circular Técnica, n. 11).
- ANGUELOVA-MERHAR, V. S. et al. β -1, 3-glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 7-8, p. 381-384, Aug. 2001.
- ANJUM, S. A. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, n. 47, p. 9640-9646, Aug. 2011.
- ARIAS, C. A. A. et al. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). In: MOSCARDI, F. et al. (Ed.). **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 100-152.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, June 1999.
- BACELAR, E. A. et al. Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure

and chemical composition of foliage and oxidative damage. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 3, p. 596-605, Mar. 2006.

BALARDIN, R. S.; MADALOSSO, M. G. Fatores que afetam a eficiência na aplicação de fungicidas. In: BORGES, L. D. (Org.). **Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas**. Passo Fundo: Plantio Direto Eventos, 2006. p. 63-67.

BALDWIN, I. T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 14, p. 8113-8118, 1998.

BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 69, n. 4, p. 473-488, Mar. 2009.

BASSANEZI, R. B. et al. Eficiência fotossintética de folhas de feijoeiro infectadas com o vírus do mosaico-em desenho, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 27, n. 1, p. 05-11, 2001.

BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 611-615, 1991.

BELHADJ, A. et al. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 24, p. 9119-9125, Nov. 2006.

BERGER, S. et al. Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of *oxylipins* on *A. thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 797-806, 2007.

BIESGEN, C.; WEILER, E. W. Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10, 11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 208, n. 2, p. 155-165, Apr. 1999.

BONALDO, S. M. et al. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTE, L. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, May 1976.

BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 183-205, 2009.

BRUCE, T. J. A. et al. *cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 12, p. 4553-4558, Mar. 2008.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CAO, S. et al. Effect of methyl jasmonate on the inhibition of *Colletotrichum acutatum* infection in loquat fruit and the possible mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 301-307, Aug. 2008.

CHAICHANA, N. et al. Response of stemona alkaloid production in *Stemona* sp. to chitosan and yeast extract elicitors. **Current Research Journal of Biological Sciences**, Austrália, v. 4, n. 4, p. 449-454, July 2012.

CHEN, J. et al. Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 31-36, Feb. 2014.

CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **TRENDS in Genetics**, Amsterdam, v. 19, n. 7, p. 409-413, July 2003.

CHINI, A. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 666-671, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da agropecuária**. Brasília: CONAB, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=74>>. Acesso em: 21 out. 2013.

CONSORCIO ANTIFERRUGEM. **Custo ferrugem asiática da soja**. [S.l]: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/?page_id=1347>. Acesso em: 10 out. 2013.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1211-1223, July 1997.

CRUZ, M. F. A. et al. Induced resistance in soybean to *Phakopsora pachyrhizi*. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p.162-172, Apr./June 2013.

CURVÊLO, C. R. et al. Mecanismos bioquímicos da defesa do algodoeiro à mancha de ramulária mediados pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 41-51, 2013.

DEL AMOR, F. M.; CUADRA-CRESPO, P. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 55-62, Jan. 2011.

DHAUBHADEL, S. et al. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 53, n. 6, p. 733-743, Dec. 2003.

DHAUBHADEL, S. Regulation of Isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds. In: NG, T.-B. (Ed.). **Soybean: biochemistry, chemistry and physiology**. India: InTech, 2011. Chap. 15, p. 243-258.

DIVYA, P.; PUTHUSSERI, B.; NEELWARNE, B. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. **Food Science and Technology**, London, v. 56, n. 1, p. 101-110, Apr. 2014.

DOMICIANO, G. P. et al. Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 5, p. 334-343, May 2010.

DOUSSEAU, S. **Ação reguladora de eliciadores nas características bioquímicas, ecofisiológicas, anatômicas e na produção e qualidade de óleo essencial de *Piper mollicomum* Kunth**. 2013. 265 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **No Brasil**. Paraná: Embrapa Soja, 2013. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=113&cod_pai=35>. Acesso em: 10 out. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja**: região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, Nov. 1971.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal-principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: SIF, 1989.

FERRER, J. L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 3, p. 356-370, Mar. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

GÁLIS, I. et al. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 573-592, May 2006.

GAYLER, S. et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade-off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 363-371, May 2004.

GAZZONI, D. L. et al. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 7, p. 673-681, 1997.

GIMENEZ-IBANEZ, S.; SOLANO, R. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. **Frontiers in Plant Science**, Washington, v. 4, p. 72, Apr. 2013.

GODOY, C. V. et al. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 63-68, Jan./Feb. 2006.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2010/11: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, Londrina, n. 87, p. 1-8, 2011.

GOELLNER, K. et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 169-177, Mar. 2010.

GRAÇA, J. P. **Cis-Jasmone e Tween 20 na indução de metabólitos secundários em soja e seus efeitos em insetos-praga**. 2012. 88 p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

GRAHAM, T. L. Biosynthesis and distribution of phytoestrogens and their roles in plant defense, signal transduction, and cell-to-cell signaling. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 2, n. 3-4, p. 93-97, 1999.

GRAHAM, T. L. et al. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 3, n. 3, p. 157-166, 1990.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Glyceollin elicitors induce major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean cell populations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, The Ohio, v. 4, p. 60-68, 1991.

GUDESBLAT, G. E.; TORRES, P. S.; VOJNO, A. A. Stomata and pathogens: warfare at the gates. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 4, n. 12, p. 1114-1116, Dec. 2009.

GUIMARÃES, L. M. P. et al. Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana-de-açúcar parasitada por *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 1, p. 11-15, 2010.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant, 2000. p. 1102-1156.

HARMAN, G. E. et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings.

Entomologia Experimentalis et Applicata, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 117-124, Apr. 2005.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 5, p. 503-512, 2002.

HOEFLE, C. et al. Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 220-226, 2009.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 181-194, Feb. 2001.

HOSSAIN, M. A. et al. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 156, n. 1, p. 430-438, 2011.

HOU, W.-C.; CHEN, Y.-C.; LIN, Y.-H. Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam var. Tainong 57). **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 39, p. 93-97, 1998.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 41-66, 2008.

HRISTOVA, V. A.; POPOVA, L. P. Treatment with methyl jasmonate alleviates the effects of paraquat on photosynthesis in barley plants. **Photosynthetica**, Prague, v. 40, n. 4, p. 567-574, 2002.

HUNZICKER, G. M. A novel regulatory system in plants involving medium-chain fatty acids. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 1, p. 143-153, Dec. 2009.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 3, p. 231-255, Mar. 2004.

KARBAN, R. et al. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. **Oecologia**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 66-71, Oct. 2000.

KUHN, O. J. et al. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 249-300, 2006.

LAGRANGE, H.; JAY-ALLGMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus hyphal* growth at picomolar concentrations. **New Phytologist**, Cambridge, v. 149, n. 2, p. 349-355, Feb. 2001.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, n. 1, p. 273-279, May 1972.

LOEHRER, M. et al. Characterization of nonhost resistance of *Arabidopsis* to the Asian soybean rust. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 11, p. 1421-1430, Nov. 2008.

LOZOVAYA, V. V. et al. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 7, p. 671-679, July/Aug. 2004.

LYGIN, A. V. et al. Response of soybean pathogens to glyceollin. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 9, p. 897-903, Sept. 2010.

LYGIN, A. V. et al. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 12, p. 1412-1420, Dec. 2009.

MA, J.; ZHAO, Y. Effect of exogenous methyl jasmonate on pathway of isoflavone synthesis in soybean. **Journal of Northeast Agricultural University**, China, v. 42, n. 5, p. 14-18, 2011.

MAGALHÃES, P. C. et al. Aspectos fisiológicos de plantas de milho infectadas por mollicutes sob diferentes níveis de água no solo. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 293-301, 2001.

MAKANDAR, R. et al. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 7, p. 861-870, July 2010.

MASON, H. S.; MULLET, J. E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 6, p. 569-579, June 1990.

MATEO, A. et al. Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, n. 1, p. 2818-2830, Sept. 2004.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C.; GIL-AD, N. L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, New York, v. 58, n. 1, p. 33-41, Sept. 2001.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 87 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Soja**. Brasília: Mapa, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 10 out. 2013.

MITTENDORF, V. et al. Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through β -oxidation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 45-55, Oct. 1999.

MOHAMMADI, M. et al. Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the causal agent of yellow rust disease. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 154, n. 3, p. 119-126, 2002.

MOLINE, H. E. et al. Comparison of three volatile natural products for the reduction of postharvest decay in strawberries. **HortScience**, Alexandria, Sept. 1997. Disponível em: <http://www.ncaur.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=73508>. Acesso em: 18 mar. 2013.

MORALES, A. M. A. P. et al. Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the *Rpp4*-mediated Asian soybean rust resistance pathway. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 40, n. 10, p. 22-26, July 2013.

MOREL, W.; YORINORI, J. T. **Situación de la roya de la soja en el Paraguay**. Capitan Miranda: CRIA, 2002.

- MUNEMASA, S. et al. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, n. 3, p. 1398-1407, Mar. 2007.
- NAOUMKINA, M. A. et al. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 829-846, Nov. 2010.
- NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 58, n. 1-3, p. 106-113, Dec. 2006.
- OKORSKI, A. et al. Effect of fungal infection and the application of the biological agent in 1tm on the rate of photosynthesis and transpiration in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Polish Journal of Natural Sciences**, Olsztyn, v. 23, n. 1, p. 35-47, 2008.
- PANTHEE, D. R. et al. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 2, p. 359-370, Jan. 2009.
- PARK, D. S. et al. Induced distal defence potentiation against *Phytophthora sojae* in soybean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 6, p. 293-310, 2002.
- PAUL, C. et al. First report of *Phakopsora pachyrhizi* adapting to soybean genotypes with *Rpp1* or *Rpp6* rust resistance genes in field plots in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 10, p. 1379-1379, Oct. 2013.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 164-170, maio/jun. 2009.
- RIVERA-VARGAS, L. I. et al. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, New York, v. 32, n. 4, p. 851-857, Mar. 1993.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, n. 1, p. 169-176, 1988.

ROSE, R. L.; SPARKS, T. C.; SMITH, M. C. Insecticide Toxicity to the *Soybean Looper* and the *Velvetbean Caterpillar* (Lepidoptera: Noctuidae) as Influenced by Feeding on Resistant Soybean (PI 227687) Leaves and Coumestrol. **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v. 81, n. 5, p. 1288-1294, 1988.

ROSSATO, L. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 371, p. 1131-1141, May 2002.

RUIZ-GARCÍA, Y.; GÓMEZ-PLAZA, E. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. **Agriculture**, Montreal, v. 3, n. 1, p. 33-52, 2013.

RUIZ-MEDRANO, R. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 202-209, June 2001.

SAITO, N. et al. Roles of RCN1, regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 9, p. 1396-1401, Sept. 2008.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's guide: version 9.2**. Cary: SAS Institute, 2009.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **Dna Research**, Tokyo, v. 8, n. 4, p. 153-161, Aug. 2001.

SCHARTE, J. et al. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. **Plant, Cell & Environment**, Baltimore, v. 28, n. 11, p. 1421-1435, Nov. 2005.

SCHNEIDER, K. T. et al. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 1, p. 355-371, Sept. 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Ed.). **Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SEO, H. S. et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4788-4793, Apr. 2001.

STASWICK, P. E. JAZing up jasmonate signaling. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, n. 2, p. 66-71, Feb. 2008.

STICHER, L. et al. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

SUN, Z. et al. Exogenous application of salicylic acid enhanced the rutin accumulation and influenced the expression patterns of rutin biosynthesis related genes in *Fagopyrum tartaricum* Gaertn leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 68, n. 1, p. 9-15, Sept. 2012.

SWARBRICK, P. J. et al. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant, Cell & Environment**, Baltimore, v. 29, n. 6, p. 1061-1076, June 2006.

TANI, T. et al. Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. **Planta**, Berlin, v. 227, n. 3, p. 517-526, Feb. 2008.

THOMMA, B. P. H. J. et al. Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 5, p. 421-427, May 2000.

THOMMA, B. P. H. J. et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 95, n. 25, p. 15107-15111, Dec. 1998.

TURNER, J. G. et al. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 1, p. S153-S164, 2002.

URBANEK, A. et al. Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 1265-1276, Sept. 2012.

VALENCIO, S. A. X. **Monitoramento da sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

VAN DE MORTEL, M. et al. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 8, p. 887-899, Aug. 2007.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

VIJAYAN, P. et al. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 95, n. 12, p. 7209-7214, June 1998.

WASTERNAK, C.; XIE, D. The genuine ligand of a jasmonic acid receptor: improved analysis of jasmonates is now required. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 4, p. 337-340, Apr. 2010.

WEISSHAAR, B.; JENKINS, G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 251-257, June 1998.

WU, C. T.; BRADFORD, K. J. Class I chitinase and beta-1, 3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, n. 1, p.263-273, Sept. 2003.

WU, J.; WANG, L.; BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? **Planta**, Berlin, v. 227, n. 5, p. 1161-1168, Apr. 2008.

YANG, X. B. et al. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 11, p. 1420-1426, 1991.

YAO, H. J.; TIAN, S. P. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved.

Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 98, n. 4, p. 941-950, 2005.

YORINORI, J. T. et al. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 675-677, June 2005.

YU, O.; MCGONIGLE, B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis.

Advances in Agronomy, San Diego, v. 86, p. 147-190, 2005.

ZAMBENEDETTI-MAGNANI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 156-160, mar./abr. 2007.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado da ferrugem asiática da soja**. Viçosa: Editora da UFV, 2006.

ZHOU, Y. Y. et al. Secondary metabolites from Glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 11, p. 6004-6010, June 2011.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST**: sistema de análise estatísticas para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1984.

APÊNDICE

APÊNDICE A Valores de QM obtidos das análises de variância para produção de compostos fenólicos em folhas de *Glycine max*

Fontes de variação	Valor de QM							
	Daidzina (ng/mg)	Rutina (ng/mg)	Malonil genistina (ng/mg)	Coumestrol (ng/mg)	Daidzeína (ng/mg)	Genisteína (ng/mg)	Genistina (ng/mg)	Malonil daidzina (ng/mg)
Produto (Prod)	7240,76***	1372,26**	92957,64***	35,66***	1,75**	0,74*	1586,58**	61307,04***
Inoculação (Inoc)	11968,61**	5675,73**	39749,79***	17,12***	11,45***	4,71***	1773,33**	154712,14***
Período	315,61 ^{ns}	1131,36**	33684,90***	1,01*	2,23***	2,74***	1483,77**	14854,00***
Prod*Inoc	400,83 ^{ns}	596,20**	18414,44***	3,58***	1,76**	0,02 ^{ns}	443,96*	18905,94***
Prod*Período	4107,49***	378,47*	40524,40***	4,14***	2,73***	2,62***	1484,79**	49537,05***
Inoc*Período	495,49 ^{ns}	530,13*	9122,77***	1,13*	2,28***	1,48***	56,83 ^{ns}	14445,83***
Prod*Inoc*Período	3897,81***	161,73 ^{ns}	20605,91***	3,74***	2,58***	0,88**	748,36***	34321,59***
Resíduo	230,63	121,2	525,85	0,43	0,22	0,17	112,59	738,59

*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ^{ns} não significativo p>0,05.

APENDICE B Valores de quadrados médios (QM) obtidos das análises de variância para a taxa fotossintética (A), teor de clorofila, condutância estomática (gs), concentração intracelular de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E), temperatura foliar (°C), eficiência de carboxilação (A/Ci), eficiência instantânea do uso da água (A/E), eficiência do uso da radiação (A/PAR) e razão entre concentrações de CO₂ intra/extracelular (Ci/Ca) e de soja que receberam aplicação de jasmonato de metila, *Tween 20* ou água, foram inoculadas ou não com *Phakopsora pachyrhizi*, avaliadas em quatro épocas. Os resultados correspondem a média de seis repetições

Fontes de variação	Valor de QM								
	A	Teor de clorofila	g _s	Ci	E	°C	A/Ci	A/E	Ci/Ca
Produto (Prod)	0,79 ^{ns}	0,23x 10 ^{-5ns}	0,03*	969,42 ^{ns}	0,14***	1,38***	0,3x 10 ^{-5ns}	0,97 ^{ns}	2,21x 10 ^{-4ns}
Inoculação (Inoc)	333,40** *	3,63x 10 ^{-5***}	2,09***	103,07 ^{ns}	7,77***	7,91***	280,1x 10 ^{-5***}	0,98 ^{ns}	1,24x 10 ^{-5ns}
Época	274,02** *	4,88x 10 ^{-5***}	0,16***	120703,87* **	2,71***	29,24***	515,8x 10 ^{-5***}	27,36* **	864,51x 10 ^{-4***}
Prod*Inoc	0,21 ^{ns}	10,6x 10 ^{-5***}	0,06***	140,78 ^{ns}	0,11***	0,12 ^{ns}	1,02x 10 ^{-8ns}	0,49 ^{ns}	22,69x 10 ^{-4ns}
Prod*Época	2,11 ^{ns}	0,21x 10 ^{-5ns}	0,06***	1394,97**	0,06**	0,57***	2,3x 10 ^{-5ns}	0,81 ^{ns} 7,61**	28,09x 10 ^{-4ns}
Inoc*Época	10,83*	0,19x 10 ^{-5ns}	0,32***	950,94 ^{ns}	1,39***	3,87***	8,3x 10 ^{-5ns}	*	25,46x 10 ^{-4ns}
Prod*Inoc*Época	1,96 ^{ns}	0,04x 10 ^{-5ns}	0,01 ^{ns}	412,84 ^{ns}	0,04*	0,30**	2,2x 10 ^{-5ns}	0,53 ^{ns}	9,02x 10 ^{-4ns}
Resíduo	3,49	0,10x 10 ⁻⁵	0,01	442,65	0,02	0,08	3,5x 10 ⁻⁵	0,93	13,16x 10 ⁻⁴

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ^{ns} não significativo p>0,05.