

MARIA FERNANDA ANTUNES DA CRUZ

INDUTORES DE RESISTÊNCIA E SILÍCIO NA INTERAÇÃO
Glycine max L. (Merrill) - *Phakopsora pachyrhizi*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C957i
2012

Cruz, Maria Fernanda Antunes da, 1983-
Indutores de resistência e silício na interação *Glycine max*
L. (Merrill) – *Phakopsora pachyrhizi* / Maria Fernanda
Antunes da Cruz. – Viçosa, MG, 2011.
xi, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ferrugem-de-soja. 2. Interação planta-patógeno.
3. Silício. 4. Soja - Resistência a *Phakopsora pachyrhizi*.
5. Ácido salicílico. 6. Ácido jasmônico. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.592

MARIA FERNANDA ANTUNES DA CRUZ

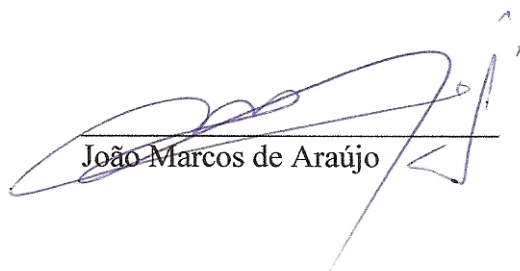
**INDUTORES DE RESISTÊNCIA E SILÍCIO NA INTERAÇÃO
Glycine max L. (Merrill)-*Phakopsora pachyrhizi***


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

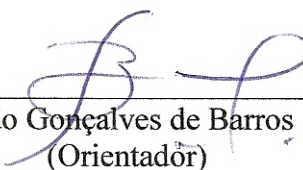
APROVADA: 03 de fevereiro de 2012.


Eveline Teixeira Caixeta


Gleiber Quintão Furtado


João Marcos de Araújo


Newton Deniz Piovesan


Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Dedico

À minha mãe Maria das Graças Antunes da Cruz e à minha avó Lucinda A. da Cruz, pelo exemplo de coragem, determinação e designação. E pelo carinho, amor, dedicação e preocupação dedicados a mim, todos esses anos.

Ao meu orientador da Graduação e Mestrado Ariano Moraes Prestes, pelo incentivo e amizade todos esses anos.

A todos que acreditaram, confiaram e torceram por mim!

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Universidade de Passo Fundo pela minha formação, e incentivo ao ingresso na Pós-graduação na Universidade Federal de Viçosa, em especial aos professores Ariano Moraes Prestes e Jurema Schons.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária- BIOAGRO- pela estrutura fornecida para a realização do trabalho.

Ao programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Estrutural que me proporcionou a realização de um trabalho desejado a muitos anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior- CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

À minha mãe e minha avó que torcem muito por mim, e a todos os familiares.

Aos amigos que acreditaram e apoiaram as minhas decisões, e sempre estiveram disponíveis para auxiliar, seja através de uma palavra de conforto, ou simplesmente como ouvintes incansáveis.

Aos funcionários da casa-de-vegetação pelo auxílio nos carregamentos de vasos, água e afins e construção de várias “gambiarras” para a realização do trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela orientação, atenção, ensinamentos e amizade durante todo esse período.

Ao professor Fabrício Ávila Rodrigues pela co-orientação e orientação nos experimentos fitopatológicos.

Ao professor Maurílio Alves Moreira pela estrutura fornecida em seu Laboratório.

Aos amigos que já foram embora de Viçosa e para os que ainda estão aqui em especial aos meus companheiros Kenner Moraes pela companhia desde sempre, e Márcia Ferreira da Silva e Larisse Freitas pela convivência, amizade e paciência em ouvir todos os desabafos nos momentos mais difíceis!

E a todos aqueles que colaboraram, intencionalmente ou não à minha formação pessoal e profissional durante esses quatro anos em Viçosa.

E em especial a todos aqueles que perto ou longe acreditam e torcem para o meu sucesso!

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Maria Fernanda Antunes da Cruz, filha de Maria das Graças Antunes da Cruz, nasceu em Passo Fundo, no estado do Rio Grande do Sul em 26 de março de 1983.

Em dezembro de 2005 formou-se Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

Em fevereiro de 2008 recebeu o título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia pela Universidade de Passo Fundo.

Em fevereiro de 2008 ingressou no curso de Doutorado do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| Acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício na resistência da soja à ferrugem asiática | 1 |
| 1. Introdução..... | 2 |
| 2. Material e Métodos | 3 |
| 2.1. Preparo do solo e tratamentos | 3 |
| 2.2. Obtenção do inóculo, inoculação e incubação das plantas | 4 |
| 2.3. Avaliação de alguns componentes de resistência | 4 |
| 2.4. Observações no microscópio eletrônico de varredura (MEV) | 5 |
| 2.5. Determinação da concentração foliar de Si | 6 |
| 2.6. Delineamento experimental e análise estatística | 6 |
| 3. Resultados | 6 |
| 4. Discussão | 11 |
| Agradecimentos | 13 |
| Referências Bibliográficas | 13 |
| Silício no processo infeccioso de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em folíolos de plantas de soja | 17 |
| Referências Bibliográficas | 21 |
| Expressão de genes de defesa na interação soja- <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em resposta a acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício em solo e em solução nutritiva | 24 |
| 1. Introdução | 25 |
| 2. Material e Métodos | 27 |
| 2.1. Experimento 1 | 27 |
| 2.2. Experimento 2 | 27 |
| 2.3. Obtenção do inóculo, inoculação e incubação das plantas | 28 |
| 2.4. Avaliação da severidade da FAS | 28 |
| 2.5. Determinação da concentração foliar de Si | 28 |
| 2.6. Coleta de material vegetal | 29 |
| 2.7. Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA | 29 |
| 2.8. Análise dos genes para o qRT-PCR | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.9. Delineamento experimental e análise estatística | 30 |
| 3. Resultados | 31 |
| Experimento 1 | 31 |
| Experimento 2 | 33 |
| 4. Discussão | 35 |
| Agradecimentos | 39 |
| Referências Bibliográficas | 39 |
| Resistance inducers and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean- <i>Phakopsora pachyrhizi</i> interaction | 43 |
| Introduction | 43 |
| Materials and methods | 45 |
| Growth of soybean plants and treatments | 45 |
| Preparation of inoculums and inoculation of plants with <i>P. pachyrhizi</i> | 45 |
| Assessment of ASR severity | 46 |
| Determination of Si concentration in leaves | 46 |
| Determination of the activities of chitinase (CHI, EC 3.2.1.14), β -1,3-glucanase (GLU, EC 3.2.1.39), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), polyphenol oxidases (PPO, EC 1.10.3.1) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) | 46 |
| Experimental design and statistical analysis | 48 |
| Results | 48 |
| Discussion | 55 |
| Acknowledgments | 57 |
| References | 57 |

RESUMO

CRUZ, Maria Fernanda Antunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Indutores de resistência e silício na interação *Glycine max* L. (Merrill)-*Phakopsora pachyrhizi***. Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: Fabrício Ávila Rodrigues e Maurílio Alves Moreira.

Este trabalho foi redigido na forma de artigos científicos, os quais já foram ou serão submetidos para publicação em periódicos nacionais e internacionais. Os artigos foram escritos em português e inglês e formatados de acordo com as exigências dos periódicos para os quais foram ou serão enviados, em congruência com as Normas de redação de Teses e Dissertações da UFV. Os resumos dos artigos contendo seus objetivos e resultados são apresentados a seguir: 1) Acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício na resistência da soja à ferrugem asiática- o objetivo deste estudo foi avaliar alguns componentes de resistência em soja supridas com silicato de cálcio (SC) em solo, ou pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico (AJ) e silicato de potássio (SP), e água desionizada (controle), e inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*. O período de incubação foi maior nas plantas dos tratamentos ASM e SC que diferiram estatisticamente das plantas do tratamento controle. Para o período latente apenas as plantas do tratamento ASM diferiram do controle. O menor número de uredínias/cm² foi verificado nas plantas do tratamento SP. As plantas pulverizadas com SP e ASM apresentaram menor severidade da ferrugem diferindo das plantas do tratamento controle. Para a área abaixo da curva do progresso da ferrugem apenas as plantas pulverizadas com SP diferiram significativamente das plantas do tratamento controle. ASM e SP foram os produtos mais eficientes para a redução dos sintomas da ferrugem asiática da soja (FAS). 2) Silício no processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja- o objetivo deste trabalho foi investigar por meio de observações em lupa e microscopia de luz e eletrônica de varredura o efeito do ácido monossilício (Si) no processo infeccioso de *P. pachyrhizi* em folíolos de soja cultivada em solução nutritiva contendo ou não Si. Nos folíolos das plantas supridas com Si, as uredínias foram menores e em menor número, houve redução de 27, 23 e 60% no número de lesões, uredínias fechadas e uredínias abertas, respectivamente. 3) Expressão gênica da interação soja-*P. pachyrhizi* em resposta a acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício em solo e em solução nutritiva- o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da aplicação de ASM, AJ e SC em solo e ácido monossilícico (Si) em solução nutritiva na expressão de seis genes de defesa (fenilalanina amônio liase - FAL, quitinase - QUI, chalcona isomerase - CHAL, lipoxigenase - LOX, proteína relacionada

a resistência - PR1, metaloproteinase - MET) na interação soja-*P. pachyrhizi* às 12, 72 e 141 horas após a inoculação (hai). Os genes de defesa foram mais expressos às 141 hai. No experimento em solo houve maior expressão dos genes FAL e CHAL nas plantas inoculadas e pulverizadas com ASM às 141 hai. As plantas supridas com SC e inoculadas apresentaram menor expressão do gene marcador do patógeno. Houve redução da severidade nas plantas dos tratamentos ASM e SC quando comparadas às plantas controle. No experimento em hidroponia às 141 hai houve menor expressão dos genes MET, LOX, PR1, QUI e CHAL nas plantas supridas com Si e inoculadas, quando comparadas às plantas não supridas com Si e inoculadas. O suprimento de Si em solução nutritiva resultou na redução de 60% da severidade da doença. 4) Indutores de resistência e silício sobre a atividade de enzimas de defesa na interação soja- *P. pachyrhizi*- o objetivo deste artigo foi determinar a influência dos indutores de resistência AJ, ASM e SC sobre a atividade das enzimas QUI, glicanase (GLI), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e FAL no patossistema soja- *P. pachyrhizi* às 24, 48, 72 e 141 hai. Houve a potencialização da atividade da enzima QUI nas plantas supridas com SC às 141 hai, e das enzimas GLI e FAL às 72 e 141 hai. Não houve potencialização da atividade das enzimas POX e PPO.

ABSTRACT

CRUZ, Maria Fernanda Antunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2012. **Defense inducers and silicon in the interaction *Glycine max* L. (Merrill)-*Phakopsora pachyrhizi*.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisors: Fabrício Ávila Rodrigues and Maurilio Alves Moreira.

This work was written in the form of scientific articles, which have been or will be submitted for publication in national and international journals. The articles have been written in Portuguese or English and formatted in accordance with the requirements of the journals for which they were or will be sent, in congruence with the thesis and dissertation writing standards of UFV. Abstracts of articles containing key objectives and results are presented below: 1) Acibenzolar-S-methyl, jasmonic acid and silicon on the resistance to soybean rust - the objective of this study was to evaluate some components of resistance in soybean supplied with calcium silicate (CS) in soil or sprayed with acibenzolar-S-methyl (ASM), jasmonic acid (JA), potassium silicate (PS) or deionized water (control), and inoculated with *Phakopsora pachyrhizi*. The incubation period was larger in plants of the CS and ASM treatments that differed statistically from control plants. For the latent period only the plants treated with ASM differed from the control. The smallest number of uredia/cm² was found in the PS treated plants. Plants sprayed with ASM and PS presented lower rust severity in relation to control plants. For the area under the rust progress curve only plants sprayed with PS were significantly different from control plants. ASM and PS were the most effective products for reducing the symptoms of Asian soybean rust (ASR). 2) Silicon in the infection process of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaflets - the objective of this study was to investigate by means of observations in a magnifier and light and scanning microscopy the effect of monosilicic acid (Si) in the infection process of *P. pachyrhizi* in leaflets of soybean grown in nutrient solution with or without Si. In leaflets of plants supplied with Si, the uredia were smaller and fewer in number, there was a reduction of 27, 23 and 60% in the number of lesions, closed and open uredia, respectively. 3) Gene expression of the soybean-*P. pachyrhizi* interaction in response to acibenzolar-S-methyl, jasmonic acid and silicon in soil and nutrient solution - the aim of this study was to investigate the effect of ASM, JA and CS in soil or (Si) in nutrient solution in the expression of six defense genes (phenylalanine ammonia lyase - PAL, chitinase - CHI, chalcone isomerase - CHAL, lipoxygenase - LOX, resistance-related protein - PR1, metalloproteinase - MET) in the interaction in soybean-*P. pachyrhizi* at 12, 72 and 141 hours after inoculation (hai). The highest expression levels of the defense genes were at

141 hai. In the soil experiment the highest expression levels were reached by PAL and CHAL in plants inoculated and sprayed with ASM at 141 hai. The plants supplied with CS and inoculated showed lower expression of the marker gene for the pathogen. Severity was reduced in plants treated with CS and ASM when compared to control plants. In the hydroponic experiment at 141 hai there was less expression of MET, LOX, PR1, CHI and CHAL in plants supplied with Si and inoculated, compared to plants not supplied with Si and inoculated. The supply of Si in the nutrient solution resulted in a 60% reduction in disease severity. 4) Resistance inducers and silicon on the activity of defense enzymes in soybean-*P. pachyrhizi* interaction - the aim of this paper was to determine the influence of resistance inducers JA, ASM and of CS on the activities of the enzymes CHI, glucanase (GLU), peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) and PAL in the pathosystem soybean-*P. pachyrhizi* at 24, 48, 72 and 141 hai. There was potentiation of CHI activity in plants supplied with CS at 141 hai and of the enzymes PAL and GLU at 72 and 141 hai. There was no potentiation of the activities of POX and PPO.

Acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício na resistência da soja à ferrugem asiática

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma doença de difícil controle pela inexistência de cultivares comerciais resistentes e pela agressividade do patógeno. Assim, o uso de indutores de resistência tem se tornado uma alternativa auxiliar no controle dessa doença. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a eficiência do acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico (AJ) e silicato de potássio (SP), aplicados via foliar, 24 horas antes da inoculação com *P. pachyrhizi* e também do silicato de cálcio (SC) aplicado no solo, na resistência da soja à FAS. Como tratamento controle, as plantas foram pulverizadas com água destilada. O processo infeccioso de *P. pachyrhizi* nas folhas das plantas dos tratamentos acima foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura. O período de incubação foi menor nas plantas do tratamento controle, o qual diferiu significativamente dos tratamentos ASM e SC. Para o período latente, apenas as plantas pulverizadas com ASM diferiram das plantas do tratamento controle. Plantas pulverizadas com SP apresentaram menor número de uredínias por cm² de área foliar em relação às plantas do tratamento controle. As plantas pulverizadas com SP e ASM apresentaram menor severidade da ferrugem sendo que as plantas dos tratamentos AJ e SC não diferiram das plantas do tratamento controle. Para a área abaixo da curva do progresso da ferrugem (AACPF), apenas as plantas pulverizadas com SP diferiram significativamente das plantas do tratamento controle. Para a severidade final (SF) estimada pelo software Quant[®], as plantas pulverizadas com AJ ou supridas com SC não diferiram das plantas do tratamento controle. Os tratamentos mais eficientes para a redução dos sintomas da FAS foram ASM e SP, os quais se destacam na redução do número de uredínias/cm² de área foliar, da AACPF e da SF.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistência induzida.

ABSTRACT

Asian Soybean Rust (ASR) caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* is a difficult disease to control due to the lack of resistant cultivars and the aggressiveness of the pathogen. Thus, the use of resistance inducers has become an alternative aid for

controlling this disease. The objective of this study was to evaluate the efficiency of acibenzolar-S-methyl (ASM), jasmonic acid (JA) and potassium silicate (PS) applied to leaves, 24 hours before inoculation with *P. pachyrhizi* and also of calcium silicate (CS) applied to the soil, in the soybean resistance to ASR. As control treatment, plants were sprayed with distilled water. The infectious process of *P. pachyrhizi* in the leaves of plants following the above treatments was evaluated by scanning electron microscopy. The incubation period was lower in control plants, which differed significantly from the CS and ASM treatments. For the latent period, only the plants sprayed with ASM differed from control plants. Plants sprayed with SP had fewer uredias/cm² of leaf area in relation to control plants. Plants sprayed with ASM and PS presented lower rust severity and plants treated with JA and CS did not differ from control plants. For the area under the rust progress curve (AURPC), only the plants treated with PS were significantly different from control plants. For the final severity (FS) estimated by the Quant[®] software, the plants sprayed with JA or supplied with CS did not differ from control plants. The most effective treatments for reducing of ASR symptoms were ASM and PS, which distinguished in the reduction the number of uredia/cm² of leaf area, the AURPC and FS.

Key words: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, induced resistance

1. Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, foi descrita pela primeira vez no Japão em 1903 (Hennings, 1903). Em meados de 1914, epidemias de ferrugem ocorreram no sudoeste da Ásia; em 1976 foi detectada na América Central e em 1990 chegou ao continente Africano (Levy, 2004). A FAS foi descrita no Paraguai em 2001, no Brasil na safra 2001/2002, na Argentina, Bolívia e Uruguai na safra 2002/2003 e na Colômbia e Estados Unidos em 2004 (Yorinori et al., 2005; Reis et al., 2006; Li et al., 2010). No Brasil, entre as safras de 2005/06 e 2008/09, houve aumento do número de relatos de ocorrência da FAS de 1369 para 2880 (Spolti et al., 2009). Os relatos de ocorrência da FAS prevaleceram nas principais regiões produtoras do País como noroeste do Rio Grande do Sul e do Paraná, sudoeste do Mato Grosso do Sul e de Goiás e noroeste da Bahia. A ferrugem, indiferente à safra, ocorreu principalmente no estágio reprodutivo das plantas (Spolti et al., 2009).

Os sintomas da ferrugem ocorrem nas folhas, onde surgem áreas cloróticas poligonais delimitadas pelas nervuras que tornam-se necróticas e nas lesões ocorre a formação das uredínias contendo urediniósporos (Reis et al., 2006). Além disso, com o aumento da intensidade da ferrugem, ocorre o amarelecimento e a abscisão foliar com consequente redução no número de vagens com grãos, número de grãos por vagem e peso de grãos (Ogle et al., 1979). A FAS torna-se mais problemática quando as plantas são infectadas por *P. pachyrhizi* no estágio de pré-floração ou durante o enchimento dos grãos (Bromfield, 1984; Hartman et al., 1991).

O controle da FAS é difícil devido a indisponibilidade de cultivares comerciais com resistência aos patótipos do fungo e também pela variabilidade do patógeno (Yamanaka et al., 2010). Dessa forma, o objetivo da maioria dos programas de melhoramento de soja tem sido o de encontrar genótipos que possam ser utilizados como fontes de tolerância e ou resistência à FAS (Hartman et al., 2005; Ribeiro et al., 2008).

Para doenças como a FAS, em que o controle é realizado apenas pela aplicação de fungicidas de forma preventiva, o uso de indutores de resistência e do silício (Si) utilizados isoladamente ou em conjunto com fungicidas é uma alternativa para reduzir a intensidade da doença (Duarte et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). Embora, a eficiência do acibenzolar-S-metil (ASM), do silicato de potássio e do silicato de cálcio já tenha sido demonstrada para o patossistema soja-*P. pachyrhizi* (Pereira et al., 2009, Rodrigues et al., 2009 e Lemes et al., 2011), o uso do ácido jasmônico (AJ) ainda não foi descrito. É interessante que alguns componentes de resistência sejam avaliados para que se possa estabelecer a eficiência do produto em teste para reduzir a severidade da FAS. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do ASM, do AJ, do silicato de potássio (SP) e do silicato de cálcio (SC) na resistência da soja à ferrugem asiática.

2. Material e métodos

2.1. Preparo do solo e tratamentos

As plantas foram crescidas em solo deficiente em Si pertencente à classe Latossolo Amarelo Ácrico, coletado na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Para o tratamento contendo Si, foi adicionado 1,7 g de silicato de cálcio (SC) (AgroSilício[®], Harsco Minerais Ltda, Timóteo, MG) por kg de solo. Para os demais tratamentos, foi acrescentado ao solo deficiente em Si, 1,14 g de carbonato de cálcio e 0,3 g de carbonato de magnésio por kg de solo com o objetivo de equilibrar a quantidade de cálcio (Ca) e de magnésio (Mg) entre os tratamentos com a quantidade

fornecida pelo SC. O solo foi incubado por 30 dias com umidade em torno de 65%. No momento da semeadura, todos os vasos receberam aplicação de 1,67 g de fosfato de cálcio. Foram utilizadas sementes do cultivar de soja MG/BR 46 (Conquista) por ser suscetível à FAS. As sementes foram desinfestadas em NaOCl 10% (v/v) por 5 min e, em seguida, lavadas em água esterilizada, secas em papel absorvente e semeadas em vasos contendo 2 kg de solo. Aos 15 dias após emergência das plântulas, essas receberam, semanalmente, 30 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). As plantas foram regadas com água desionizada diariamente.

As plantas crescidas em solo deficiente em Si foram pulverizadas com (i) água desionizada (tratamento controle), (ii) acibenzolar-S-metil (ASM) (0,4 g/L)(Bion[®], 500 WG Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil), (iii) ácido jasmônico (AJ) (2 mM) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e (iv) silicato de potássio (SP) (20 g/L) (FertiSil[®], PQ Silicas Brasil Ltda, São Paulo, SP) 24 horas antes da inoculação com *P. pachyrhizi*. O quinto tratamento foi composto por plantas que cresceram em solo contendo SC. Água desionizada e as soluções de ASM, de AJ e de SP foram pulverizadas nas porções abaxial e adaxial das folhas de cada planta, utilizando-se atomizador manual. Cada planta recebeu 25 mL de água desionizada e de cada solução até o ponto de escorrimento.

2.2. Obtenção do inóculo, inoculação e incubação das plantas

O inóculo foi obtido através da multiplicação prévia de um isolado monopostular de *P. pachyrhizi* multiplicado sob o cultivar MG/BR 46. Os urediniósporos foram armazenados em freezer -80 °C até o momento da inoculação. A dormência dos urediniósporos foi quebrada por 10 min a 40 °C em banho Maria, seguido por 24 horas de câmara úmida. Plantas de soja no estágio V6 (Fehr & Caviness, 1977) foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^5 urediniósporos/mL, com 89% de poder de germinação. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara de nevoeiro com temperatura de 24 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ por 24 h na ausência de luz. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 28 ± 4 °C e nebulização com duração de 1min a cada 30 min.

2.3. Avaliação de alguns componentes de resistência

As folhas V4, V5 e V6 (Fehr e Caviness, 1977) das plantas de cada tratamento foram marcadas com fitas coloridas para avaliação do período de incubação (PI), do período latente (PL₅₀), da severidade e do número de uredinias e de lesões por cm² de

área foliar. O PI foi avaliado observando-se o aparecimento das lesões nas folhas marcadas a cada dia após inoculação (dai). Para determinar o início da formação das uredinias, cinco lesões em cada folíolo das folhas marcadas foram aleatoriamente selecionadas. As lesões foram examinadas todos os dias após inoculação com uma lupa de mão ($\times 10$). O PL₅₀ foi atingido quando 50% das lesões examinadas apresentaram uredinias. A severidade foi avaliada de acordo com a escala diagramática de Godoy et al. (2006) aos 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dai. Os dados da severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da ferrugem (AACPF) de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1977). Após a última avaliação da severidade, três áreas aleatoriamente selecionadas em cada folíolo das folhas marcadas foram usadas para contar, sob lupa, o número de lesões e de uredinia/ cm² de área foliar. Todas as folhas marcadas foram digitalizadas a 200 dpi e a severidade final (SF) foi quantificada utilizando-se o software Quant[®] (Vale et al., 2003).

2.4. Observações no microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Fragmentos de folhas (5 mm²) com sintomas da FAS foram coletados aos 9 dai e colocados em frascos de vidro e fixados em solução glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e armazenados em geladeira. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 h à temperatura ambiente. Os fragmentos foram lavados com esse mesmo tampão por quatro vezes durante 10 min cada e desidratados em uma série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas, sendo realizadas três passagens na última concentração no mesmo intervalo de tempo. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico utilizando-se o aparelho “Critical Point Dryer” (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos foram montados sobre suportes metálicos de alumínio contendo fita adesiva dupla-face e cobertos com ouro coloidal por meio de metalização no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit” (Modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Para observar a colonização de *P. pachyrhizi* no tecido foliar, a epiderme de algumas amostras foi removida com fita adesiva antes da metalização. Os fragmentos foram examinados no MEV (modelo Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) operado a 10 Kv para obtenção das eletromicrografias.

2.5. Determinação da concentração foliar de Si

Após o término das avaliações, as folhas das plantas das repetições dos tratamentos controle e SC foram coletadas, lavadas em água desionizada e secas a 65 °C durante 72 h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley com peneira de 40 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica da digestão alcalina de 0,1 g de tecido seco (Korndörfer et al., 2004).

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. O experimento foi repetido três vezes. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo duas plantas de soja. Os dados do PI, PL₅₀, AACPF, número de uredínias e de lesões/cm² de área foliar e SF foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (versão 9.0; Statistical Analysis System). Para o PI e PL₅₀ não houve diferença significativa entre os três experimentos e os dados foram agrupados para a análise.

3. Resultados

A concentração foliar de Si nas folhas das plantas de soja supridas com SC foi significativamente maior (2,6 g/kg) em relação às plantas do tratamento controle (0,6 g/kg). Houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI (Tabela 1). No entanto, apenas as plantas pulverizadas com ASM e supridas com SC diferiram estatisticamente das plantas dos tratamentos controle (Tabela 1). Para o PL₅₀, apenas as plantas pulverizadas com ASM diferiram significativamente das plantas do tratamento controle. As plantas pulverizadas com ASM não diferiram estatisticamente das plantas dos tratamentos AJ, SC e SP (Tabela 1).

TABELA 1. Período de incubação (PI) e período latente (PL₅₀) da ferrugem asiática em folíolos de plantas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e submetidas a diferentes tratamentos¹.

| Tratamentos | PI (dias) | PL ₅₀ |
|----------------------|---------------------|------------------|
| Controle | 5,33 C ² | 7,97 B |
| Ácido jasmônico | 5,41BC | 8,03 AB |
| Acibenzolar-S-metil | 5,67 AB | 8,26 A |
| Silicato de cálcio | 5,80 A | 8,23 AB |
| Silicato de potássio | 5,62 ABC | 8,09 AB |
| C.V. (%) | 5,04 | 3,05 |

C.V. = coeficiente de variação.

¹ Dados de três experimentos combinados.

² Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste Tukey a 5%.

Para o número de lesões por cm² de área foliar, houve diferença significativa entre os tratamentos apenas nos experimentos 2 e 3 (Tabela 2). No experimento 2, as plantas pulverizadas com AJ, ASM e SP e crescidas em solo suprido com SC não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram significativamente das plantas do tratamento controle (Tabela 2). No experimento 3, as plantas pulverizadas com ASM e SP diferiram significativamente das plantas dos tratamentos controle e SC para o número de lesões por cm² de área foliar. As plantas do tratamento controle, SC e AJ não diferiram significativamente entre si para o número de lesões por cm² de área foliar no experimento 3 (Tabela 2).

TABELA 2. Número de lesões de ferrugem e número de uredínias de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos em três experimentos independentes.

| Tratamentos | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
|----------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| | Lesões/cm ² | Uredínias/cm ² | Lesões/cm ² | Uredínias/cm ² | Lesões/cm ² | Uredínias/cm ² |
| Controle | 18,56 A ¹ | 64,95 B | 41,01 A | 125,02 A | 32,27 A | 80,93 A |
| Ácido jasmônico | 16,86 A | 98,30 A | 32,51 B | 107 B | 28,53 AB | 76,00 A |
| Acibenzolar-S-metil | 15,84 A | 38,26 CD | 31,54 B | 95,43 B | 26,58 B | 56,79 B |
| Silicato de cálcio | 16,82 A | 49,86 C | 30,52 B | 99,58 B | 31,54 A | 75,17 A |
| Silicato de potássio | 15,94 A | 31,91 D | 28,86 B | 75,27 C | 27,03 B | 64,96 B |
| CV (%) | 30,16 | 35,99 | 27,04 | 28,84 | 25,48 | 25,97 |

C.V. = coeficiente de variação.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste Tukey a 5%.

Para o número de uredínias por cm² de área foliar, houve diferença significativa entre os tratamentos nos três experimentos. No experimento 1, as plantas pulverizadas com AJ apresentaram o maior número de uredínias por cm² de área foliar com diferença significativa para os tratamentos controle, ASM, SC e SP. Já nas plantas pulverizadas com SP observou-se o menor número de uredínias por cm² de área foliar com diferença significativa para os tratamentos AJ, controle e SC (Tabela 2). No experimento 2, o maior número de uredínias por cm² de área foliar ocorreu para o tratamento controle, o qual diferiu significativamente dos tratamentos AJ, ASM, SC e SP (Tabela 2). O menor número de uredínias por cm² de área foliar ocorreu para as plantas pulverizadas com SP, com diferença significativa para os tratamentos controle, AJ, ASM e SC (Tabela 2). No experimento 3, não houve diferença significativa entre os tratamentos ASM e SP para o número de uredínias por cm² de área foliar. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle, AJ e SC (Tabela 2).

Para a AACPF, houve diferença significativa entre os tratamentos em todos os experimentos (Tabela 3). No experimento 1, os tratamentos AJ, ASM, SC e SP não diferiram significativamente entre si quanto a AACPF, mas diferiram do tratamento controle (Tabela 3). No experimento 2, não houve diferença significativa entre os tratamentos SP e ASM, porém o tratamento SP diferiu estatisticamente dos tratamentos controle, AJ e SC (Tabela 3). No experimento 3, os tratamentos SP e ASM diferiram significativamente do tratamento controle, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos ASM e AJ (Tabela 3). Nos experimentos 2 e 3, houve redução de 62 e 63% na AACPF para os tratamentos SP em relação ao tratamento controle.

TABELA 3. Área abaixo da curva do progresso da ferrugem (AACPF) em folhas de plantas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e submetidas a diferentes tratamentos em três experimentos independentes.

| Tratamentos | AACPF | | |
|----------------------|---------------------|----------|----------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| Controle | 2299 A ¹ | 1013,5 A | 851,5 A |
| Ácido jasmônico | 1443,3 B | 881,9 A | 676,1 AB |
| Acibenzolar-S-metil | 1189,8 B | 702,7 AB | 389,1 BC |
| Silicato de cálcio | 1536 B | 988,6 A | 820,8 A |
| Silicato de potássio | 1239,5 B | 389 B | 315,6 C |
| C.V. (%) | 14,21 | 22,18 | 23,98 |

C.V. = coeficiente de variação.

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste Tukey a 5%.

Para a SF, houve diferença significativa entre os tratamentos para os três experimentos (Tabela 4). Os tratamentos ASM e SP diferiram estatisticamente dos tratamentos AJ e controle nos três experimentos (Tabela 4). No experimento 1, os tratamentos ASM e SP não diferiram significativamente do tratamento SC. Não houve diferença significativa dos tratamentos ASM, SP e SC para os tratamentos controle e AJ. No experimento 2, não houve diferença significativa entre os tratamentos controle, AJ e SC. No experimento 3, não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e AJ e nem entre o tratamentos SC e AJ (Tabela 4).

TABELA 4. Severidade final (SF) da ferrugem asiática, estimada pelo software Quant[®], em folhas de plantas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e submetidas a diferentes tratamentos em três experimentos independentes.

| Tratamentos | SF (%) | | |
|----------------------|----------------------|---------|----------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| Controle | 72,40 A ¹ | 59,28 A | 90,04 A |
| Ácido jasmônico | 69,85 A | 56,80 A | 65,07 AB |
| Acibenzolar-S-metil | 16,75 B | 21,83 B | 14,45 C |
| Silicato de cálcio | 45,33 AB | 56,88 A | 46,98 B |
| Silicato de potássio | 23,00 B | 21,83 B | 9,79 C |
| C.V. (%) | 46,30 | 42,05 | 39,57 |

C.V. = coeficiente de variação

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste Tukey a 5%.

Nos folíolos das plantas dos tratamentos SC, AJ e controle, observou-se, em média, de três a quatro uredínias bem desenvolvidas (Fig. 1A, C e E) enquanto que nos folíolos das plantas dos tratamentos ASM e SP ocorreu, em média, duas uredínias (Fig. 1B e D). As uredínias encontradas nos folíolos das plantas do tratamento SP eram menores e mais compactas do que as uredínias contidas nos folíolos das plantas dos tratamentos controle, AJ, ASM, SC (Fig. 1D). Nos folíolos das plantas do tratamento controle constatou-se intensa produção de urediniósporos depositados na epiderme abaxial do folíolo (Fig. 1E). A remoção da epiderme dos folíolos possibilitou visualizar a intensa colonização de *P. pachyrhizi* nos tecidos do parênquima lacunoso, principalmente nos folíolos obtidos das plantas dos tratamentos AJ e SC (Fig. 1 C e D).

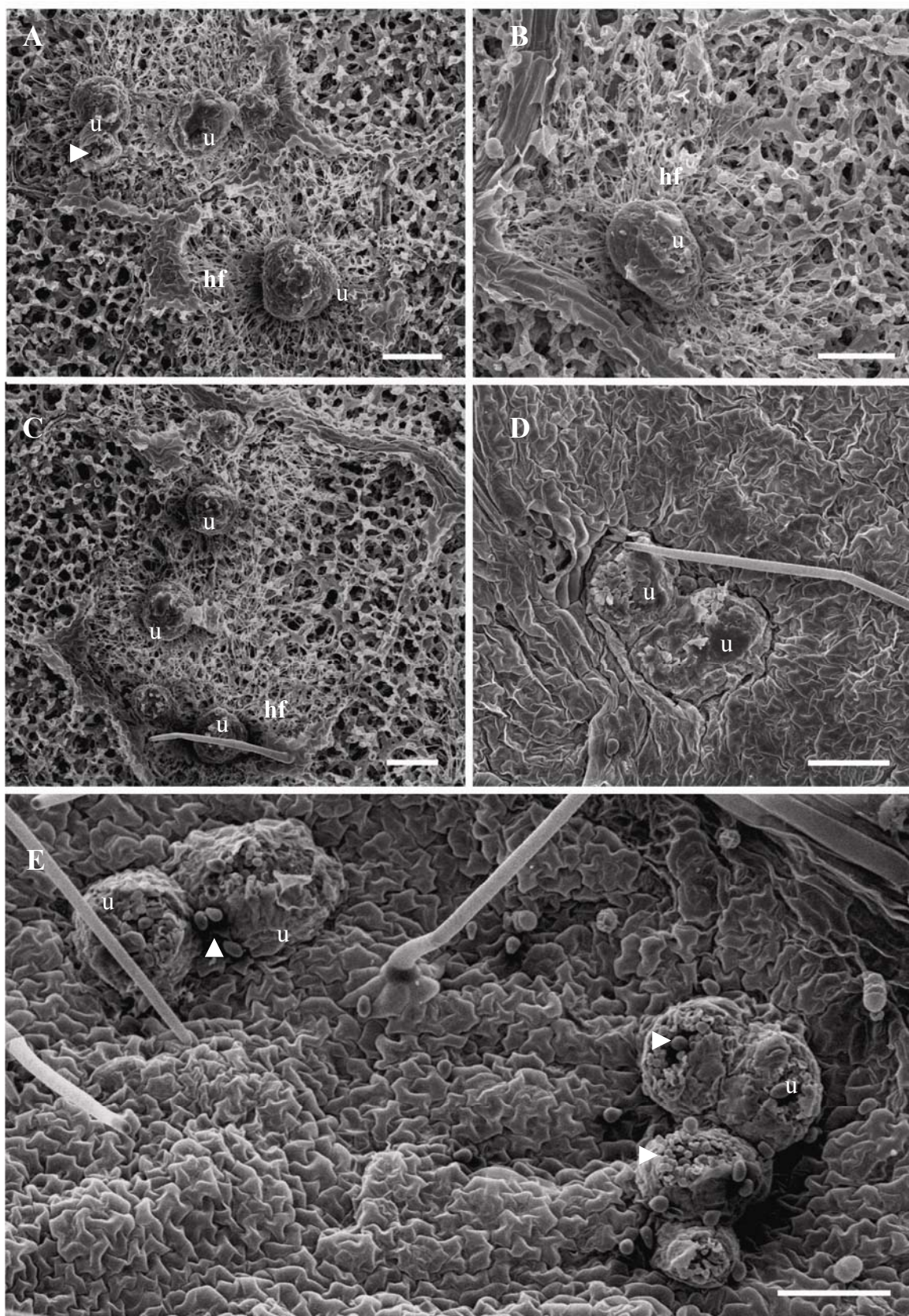


FIGURA 1. Microscopia eletrônica de varredura de folíolos de plantas de soja que foram crescidas em solo contendo silicato de cálcio (A); pulverizadas com acibenzolar-S-metil (B), ácido jasmônico (C), silicato de potássio (D) e água destilada (E). u - uredinia, cabeça de seta - urediniósporos, hf- hifas. Barras = 100 μ m.

4. Discussão

Sabendo da importância comercial da soja para o país, do alto custo de produção propiciado pela aplicação de fungicidas para o controle da FAS e a inexistência de cultivares resistentes, o presente estudo vem complementar os dados apresentados por alguns autores referente à eficiência do indutor ASM e do SP na redução da severidade da FAS (Pereira et al., 2009; Rodrigues et al., 2009; Lemes et al., 2011). No presente estudo, a maior concentração foliar de Si nas plantas do tratamento com SC evidencia a translocação do elemento das raízes para as folhas em uma espécie considerada acumuladora intermediária para Si (Jones & Handreck, 1967). Mesmo encontrado em baixa concentração nas folhas, as plantas supridas com SC apresentaram maior PI quando comparadas às plantas do tratamento controle. Esse dado corrobora Lemes et al. (2011), que em experimentos com solo suprido com SC em campo e casa de vegetação verificaram aumento do PI e reduções significativas da severidade da FAS.

O suprimento de Si para culturas como o sorgo e o arroz tem sido eficiente em reduzir os sintomas da antracnose (Resende et al., 2009), da mancha marrom (Dallagnol et al., 2009) e da brusone (Rodrigues et al., 2005). No patossistema modelo arroz-*Pyricularia grisea*, a resistência à brusone tem sido atribuída à deposição de uma camada de Si logo abaixo da cutícula, fato que dificulta e/ou retarda a penetração do patógeno (Kim et al., 2003). No entanto, a ativação diferencial de genes relacionado ao metabolismo e defesa de plantas de arroz supridas com Si e desafiadas com *P. grisea* foi demonstrado por Brunings et al. (2009). Rodrigues et al. (2005) relataram uma acumulação diferencial de transcritos de glucanase, peroxidase e PR-1 associados com a limitação da colonização de *P. grisea* em folhas de plantas de uma cultivar de arroz suscetível. Dessa forma, verifica-se que o Si além de funcionar como uma barreira mecânica, de proteção a penetração pelo patógeno, também contribui para a resistência da planta através da produção de uma barreira química resultante da ativação e acumulação de compostos de natureza antimicrobiana (Fawe et al., 1998).

A aplicação de SP contribuiu para reduzir a severidade da FAS, além do número de uredínias por cm² de área foliar e a AACPF corroborando com os resultados de Rodrigues et al. (2009) e Lemes et al. (2011). Para esses autores, em estudos em campo e casa de vegetação, a aplicação de SP foi eficiente na redução da severidade de FAS em cerca de 70% em relação às plantas do tratamento controle e redução da AACPF em 36%. Duarte et al. (2009) não obtiveram efeito significativo da aplicação de SP na

AACPF e na severidade máxima da FAS em experimentos realizados em condições de campo.

Assim como o SP, o ASM foi eficiente em reduzir a AACPF, a SF e o número de lesões e de uredinias por cm² de área foliar. O ASM está entre os indutores mais utilizados para o patossistema soja-*Phakopsora pachyrhizi* isoladamente ou em mistura com fungicidas (Dallagnol et al., 2006; Duarte et al., 2009; Pereira et al., 2009). Para Dallagnol et al. (2006), a aplicação de ASM com os fungicidas difenoconazole e azoxystrobin, aumentou a eficiência desses fungicidas em reduzir a severidade das doenças de final de ciclo na cultura da soja, entre elas a FAS. Duarte et al. (2009) verificaram efeitos intermediários na redução da severidade da FAS com aplicações de ASM, de mancozebe e de mancozebe+SP em comparação com a aplicação do fungicida tebuconazole. No entanto, é importante observar que o ASM apresenta estrutura química semelhante ao ácido salicílico (AS) e age de modo distinto em diferentes patossistemas. No patossistema tomate-*Oidium neolycopersici*, o AS não está envolvido na defesa, porém no patossistema fumo-*Oidium neolycopersici*, o AS é indispensável na resposta de resistência. Para fumo-*Botrytis cinerea*, o AS não contribui para a resistência, porém no patossistema tomate-*Botrytis cinerea*, na ausência de AS, houve aumento na suscetibilidade das plantas (Achuo et al., 2004). Para Luo et al. (2011), a aplicação de AJ seguido por AS foi mais eficiente em inibir a replicação do *cucumber mosaic virus* do que a aplicação dos indutores AS e AJ separados ou combinados).

As plantas do presente estudo, que receberam a aplicação de AJ tiveram padrões de resposta à infecção por *P. pachyrhizi* iguais ou mais severos que as plantas do tratamento controle, nesse estudo o AJ agiu como um indutor de suscetibilidade às plantas. Para a interação *Colletotrichum orbiculare*-pepino, enquanto ASM induz resistência local e sistêmica, AJ induz suscetibilidade. Ou seja, existe um antagonismo entre essas duas rotas. Enquanto o ASM leva à expressão do gene que codifica a quitinase (CHI 2) e suprime a formação de lesões nas folhas, o tratamento com AJ suprime a expressão desse gene e causa maior suscetibilidade em folhas (Liu et al., 2008)

A aplicação dos indutores de resistência, do SP e do suprimento do solo não alteraram o processo infeccioso de *P. pachyrhizi*. No entanto, para os tratamentos ASM e SP, constatou-se redução do número de uredinias. Para as plantas pulverizadas com SP ainda foi possível verificar uredinias menores e mais compactas do que para os demais tratamentos. Este fato pode estar relacionado à proteção física proporcionada pela formação de placas de silicato que dificultariam a penetração do patógeno,

atrasando a formação das uredínias e o rompimento da epiderme para a dispersão dos urediniosporos. Para Lemes et al. (2011), o atraso no aparecimento dos sintomas da FAS com a aplicação de SC e SP pode ser explicado pela produção de uma camada subcuticular rica em Si. Além disso, um número menor de uredínias, de menor tamanho em relação às obtidas nos folíolos das plantas do tratamento controle, pode estar relacionado à menor produção de urediniosporos.

Os resultados do presente estudo demonstram que a aplicação de ASM e do SP reduz o número de uredínias/cm² de área foliar, a AACPF e a SF da FAS. Assim, o uso desses produtos, em associação com as práticas culturais adequadas, poderá contribuir para a diminuição dos danos causados pela FAS na produção de soja.

Agradecimentos

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo recurso financeiro. Ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa dos professores FA Rodrigues, MA Moreira e EG Barros. Os autores agradecem às empresas Syngenta Proteção de Cultivos Ltda e a empresa Harsco Minerais Ltda pelo fornecimento do Bion[®] e do AgroSilício[®], respectivamente e também ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (CCB/UFV) pela utilização do MEV e os equipamentos auxiliares.

Referências Bibliográficas

- Achuo E. A., Audenaert K., Meziane H., & Höfte M. (2004). The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53, 65-72.
- Bromfield, K.R. Soybean rust. Monograph nº11. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 63p. 1984.
- Brunings, A.M., Datnoff, L.E., Ma J.F., Mitani, N., Nagamura, Y., Rathinasabapathi, B. and Kirst, M. (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals Applied Biology*, 155, 161-170.
- Dallagnol L.J., Navarini L., Ugalde M.G., Balardin R.S., & Catellam R. (2006). Utilização de acibenzolar-S-methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathologica*, 32, 255-259.

- Duarte H.S.S., Zambolim L., Rodrigues F.A, Rios J.A., & Lopes U.P. (2009). Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. *Ciência Rural*, 39, 2271-2277.
- Fawe A., Menzies, J.G. Chérif M., & Bélanger, R.R. (2001). Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: Datnoff, L.E., Snyder, G.H., Korndörfer, G.H. (Eds.) *Silicon in Agriculture*. Elsevier Science B.V. 159-169.
- Fehr, W.R. & Caviness, C.E. (1977) Stages of soybean development. Ames: Iowa State University Press. (Special report 80).
- Godoy CV, Koga LJ, Canteri MG. (2006). Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31,63-68.
- Hartman, G.L., Wang, T.C., & Tschanz, A.T. (1991). Soybean rust development and qualitative relationship between rust severity and soybean yield. *Plant Disease*, 75, 596-600.
- Hartman, G.L., Miles, M.R., & Frederick, R.D. (2005). Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, 89, 664-666.
- Hennings, V.P. (1903). A few new Japanese Uredinaceae. *Hedwigia*, 42,107-108.
- Hoagland R, Arnon I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347,1-32.
- Jones LHP, Handreck KA. (1967). Silica in soils, plants, and animals. *Advances in Agronomy*, 19,107-49.
- Kim, S. G., Kim, K. W., Park, E. W., & Choi, D. (2003). Silicon- induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92, 1095-1103.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia. Boletim Técnico 2.
- Lemes, E.M., Mackowiak, C.L., Blount, A., Marois, J.J., Wright, D.L., Coelho, L., & Datnoff, L.E. (2011) Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. *Plant Disease*, 95, 317- 324.
- Levy, C. (2004) Zimbabwe- A country report on soybean rust control.p. 340-348 in: Proc. VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Mundial de soja (Brazilian Soybean Conference). F.Moscardi, C.B. Hoffman-campo, O. Ferreira Saraiva, P.R. Galerani, F.C. Kryzanowski, and M.C. Carrão- panizzi, eds. Embrapa Soybean, Londrina.

- Li, X., Esker, P.D., Pan, Z., Dias, A.P., Xue, L., & Yang, X.B. (2010). The uniqueness of the soybean rust pathosystem. *Plant Disease*, 94, 796-806.
- Liu C., Ruan Y., Lin Z., Wei R., Peng Q., Guan C., & Ishii H. (2008). Antagonism between acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 141-145.
- Luo Y., Shang J., Zhao P., Xi D., Yuan S., & Lin H. (2011). Application of jasmonic acid followed by salicylic acid inhibit Cucumber mosaic virus replication. *The Plant Pathology Journal*, 27, 53-58.
- Ogle, H.J., Byth, D.E., & McLean, R. (1979). Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in South-eastern Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30, 883- 893.
- Pereira S.C., Rodrigues F.A., Carré-missio V., Oliveira M.G.A, & Zambolim L. (2009). Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology*, 34, 164- 170.
- Reis EM, Bresolin ACR, Carmona M. (2006) Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo.
- Resende, R.S., Rodrigues, F.A., Soares, J.M., and Casela, C.R. (2009) Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal Plant Pathology*. 124, 533-541.
- Rodrigues F.A., Duarte H.S.S., Domiciano G.P., Souza C.A., Korndörfer G.H., & Zambolim L. (2009). Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australian Plant Pathology*, 38, 366-372.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA. (2005). Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 144-159.
- Shaner G, Finney RE. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67,1051-1056.
- Spolti P., Godoy C.V., & Del Ponte E.M. Sumário da dispersão em larga escala das epidemias de ferrugem asiática da soja no Brasil em quatro safras (2005/06 a 2008/09). In: Reunião o consórcio antiferrugem, 2009, Londrina. Anais da Reunião do consórcio Antiferrugem, 2009. P. 11-20.
- Yamanaka N., Yamaoka Y., Kato M., Lemos N.G., Passianotto A.L.L., Santos J.V.M., Benitez E.R., Abdelnoor R.V., Soares R.M., & Suenaga K. (2010). Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence

among Japanese and Brazilian rust population. *Tropical Plant Pathology*, 35, 153-162.

Yorinori, J.T., Paiva, W.M., Frederick, R.D., Costamilan, L.M., Bertagnolli, P.F., Hartman, G., Godoy, C. V., & Nunes Junior, J. (2005). Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. *Plant Disease*, 89, 675-677.

Vale, F.X.R., Fernandes Filho, E.I., & Liberato, J.R. QUANT: a software plant disease severity assessment. In: *International Congress of Plant Pathology*, 8., 2003, Christchurch Proceedings... Christchurch New Zealand: Plant Pathology Society, 2003.p.105.

Silício no processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja¹

Maria Fernanda Antunes da Cruz⁽¹⁾, Larisse de Freitas Silva⁽¹⁾, Fabrício Ávila Rodrigues⁽²⁾, João Marcos de Araujo⁽¹⁾ e Everaldo Gonçalves de Barros⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Avenida P. H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa MG. E-mail: fertunes@bol.com.br, larisse_bio@yahoo.com.br, jmaraujo@ufv.br, ebarros@ufv.br ⁽²⁾Departamento de Fitopatologia. E-mail: fabricio@ufv.br

Resumo – Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do silício (Si) no processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja cultivadas em solução nutritiva contendo ou não Si. Observações realizadas sob microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura indicaram que nos folíolos das plantas supridas com Si, as uredínias foram menores e em menor número. Houve redução de 27, 23 e 60% no número de lesões, uredínias fechadas e uredínias abertas, respectivamente, nos folíolos das plantas supridas com Si. Plantas de soja supridas com Si apresentam redução nos sintomas da ferrugem asiática.

Termos para indexação: *Glycine max*, ferrugem asiática, nutrição mineral, resistência.

Silicon on the infection process of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaflets

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of silicon (Si) in the infection process of *Phakopsora pachyrhizi* in leaflets of soybean plants grown in nutrient solution with or without Si. Observations carried out in light microscope and scanning electron microscope indicated that in leaflets of plants supplied with Si, uredia were smaller and fewer in number. There were reductions of 27, 23, and 60% in the number of lesions, open uredia, and closed uredia, respectively, in leaflets of plants supplied with Si. Soybean plants supplied with Si show reduction in Asian Soybean Rust symptoms.

Index terms: *Glycine max*, Asian Soybean Rust, mineral nutrition, resistance.

¹ Artigo aceito para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais destrutivas da cultura da soja devido à desfolha prematura, ocasionando, assim, significativas perdas na produção (Hartman et al., 2005). Os sintomas iniciais dessa doença são áreas cloróticas nas folhas, principalmente em plantas no estágio de floração, nas quais, posteriormente, surgem uredínias de cor pardo-clara a pardo avermelhadas, sub-epidérmicas e erumpentes, contendo inúmeros urediniósporos (Reis et al., 2006).

A principal medida de controle da FAS é o uso de fungicidas, uma vez que cultivares comerciais com resistência completa à doença ainda não estão disponíveis (Hartman et al., 2005; Li et al., 2010). Porém, o uso de fungicidas aumenta o custo de produção (Yorinori et al., 2005), além de causar danos ao meio ambiente. Neste cenário, a nutrição mineral com base no fornecimento de silício (Si) às plantas torna-se uma alternativa para reduzir a intensidade de doenças em inúmeras espécies de plantas (Datnoff et al., 2007). No entanto, estudos mostrando a eficiência do uso do Si visando reduzir a severidade da FAS ainda são escassos e não conclusivos (Rodrigues et al., 2009; Lemes et al., 2011), principalmente detalhando os aspectos citológicos da interação soja-*P. pachyrhizi*.

O objetivo deste trabalho foi investigar, em nível microscópico, o efeito do Si na interação soja-*P. pachyrhizi*.

Plântulas de soja (cv. MG/BR 46, Conquista) foram crescidas em vasos plásticos contendo 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), com algumas modificações: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM, NH_4NO_3 1 mM, KNO_3 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, KCl 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, H_3BO_3 0,2 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{Na}_2\text{EDTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite[®], Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol Si L⁻¹ (+Si). O pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 5,8 com HCl ou NaOH 1 M e trocada a cada três dias. As plantas cresceram em casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em sistema de hidroponia com aeração constante.

Ao atingirem o estágio V6 (Fehr & Caviness, 1977), as plantas foram pulverizadas com uma suspensão de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, na concentração de 1×10^4 urediniósporos/mL até o escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (24 h no escuro e umidade relativa de $95 \pm 5\%$) e, após

esse período, foram transferidas para casa de vegetação, com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 24 ± 2 °C, e umidade relativa de $95 \pm 5\%$. Aos 10 dias após a inoculação (dai), avaliou-se o número de lesões, o número de uredínias fechadas (não desenvolvidas) e de uredínias abertas (completamente desenvolvidas e liberando urediniósporos) em dois folíolos por planta. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso com oito repetições, sendo três plantas por repetição. Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a significância dos tratamentos foi obtida pelo teste *F* ao nível de 5% de probabilidade.

Para a microscopia de luz, aos 10 dai foram coletados 12 folíolos de soja. De cada folíolo foram seccionados dois fragmentos de 10 mm² com sintomas de FAS. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 48 h, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Foram analisados 12 blocos por tratamento, sendo que cada bloco foi composto por dois fragmentos de folíolo. Cortes transversais de 5 µm de espessura, obtidos com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (Modelo RM 2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) foram corados com azul de toluidina a 0,05% (pH 4,7). De cada bloco foram amostradas seis lâminas com 12 cortes. Os cortes semi-finos foram observados em microscópio de luz (Modelo AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema fotográfico U-Photo e câmera digital (Modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc. Nova Iorque, EUA).

Para as observações no microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram coletados oito folíolos, de cada folíolo foram amostrados dois fragmentos de 5 mm² com sintomas de FAS. As amostras foram transferidas para frascos de vidro contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e armazenadas em geladeira. Após uma semana, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato de sódio por quatro vezes durante 10 min e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 h à temperatura ambiente (Curvelo et al., 2010). Em seguida as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas, sendo realizadas três passagens na última concentração no mesmo intervalo de tempo. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico utilizando-se o aparelho “Critical Point Dryer” (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e montados sobre suportes metálicos de alumínio cobertos com fita adesiva dupla face (Curvelo et

al., 2010). Para visualizar as estruturas de *P. pachyrhizi* no interior do tecido foliar, a epiderme de alguns fragmentos foi removida com fita adesiva. Em seguida, todos os fragmentos foram cobertos com ouro coloidal por metalização no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit” (Modelo FDU010, Bal- Tec, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos foram examinados no MEV (Modelo Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) operado a 10 kV para obtenção das eletromicrografias

Observou-se no parênquima lacunoso das amostras dos folíolos de plantas supridas ou não com Si, uma grande quantidade de hifas de *P. pachyrhizi* na região das uredínias (Fig. 1 A-D), provavelmente, devido à disponibilidade de nutrientes nas células do parênquima lacunoso e paravenal. As hifas penetraram nas células supostamente saudáveis, as quais, gradativamente, adquiriram aspecto plasmolisado (Fig. 1A-B), culminando em necrose. Nos folíolos das plantas não supridas com Si, surgiram espaços entre os urediniósporos e houve aumento no tamanho das uredínias (Fig. 1 A-D). Os urediniósporos tornaram-se equinulados e fortemente corados pelo azul de toluidina. A epiderme abaxial rompeu-se com concomitante liberação dos urediniósporos (Fig. 1 A-B). Nos folíolos das plantas não supridas com Si, as uredínias, encontravam-se, na sua maioria, completamente desenvolvidas (abertas e contendo urediniósporos) (Fig. 1 A, B e E) ao contrário das uredínias observadas nos folíolos das plantas supridas com Si, as quais apresentaram-se, na sua maioria, fechadas (Fig. 1 C, D e F).

Nos folíolos das plantas supridas com Si, houve redução de 27, 23 e 60%, respectivamente, nos números de lesões, de uredínias não desenvolvidas (fechadas) e de uredínias completamente desenvolvidas (abertas liberando urediniósporos) por folíolo em comparação com os folíolos das plantas não supridas com Si (Tabela 1). Lemes et al. (2011) verificaram reduções de 43 e 36% na área abaixo da curva do progresso da FAS, respectivamente, quando plantas de soja foram cultivadas em solo contendo silicato de cálcio ou foram pulverizadas com silicato de potássio, além de aumento em até três dias para o aparecimento dos sintomas da doença. Resultados semelhantes também foram obtidos por Rodrigues et al. (2009), os quais reportaram redução de 70% na severidade da FAS com a aplicação foliar de silicato de potássio. Lima et al. (2010) ao cultivarem plantas de soja em solução nutritiva contendo doses crescente de Si e inoculadas com *P. pachyrhizi*, observaram redução na área abaixo da curva do número de lesões da FAS e aumento nas concentrações de lignina. Acredita-se que deposição de Si no apoplasto dos tecidos foliares pode evitar a penetração de fungos patogênicos através da formação de uma barreira física (Datnoff et al., 2007). Além disso, o Si pode

potencializar os mecanismos de defesa da planta à infecção por patógenos (Fauteux et al., 2005).

O Si reduz os sintomas da FAS e pode ser uma possibilidade para o manejo integrado dessa doença.

Referências bibliográficas

CURVELO, CRS.; RODRIGUES, FA.; BERGER, P.G.; REZENDE, D. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.2, p. 108-113. 2010.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Nutrition. In: DATNOFF L.E.; ELMER W.H.; HUBER D.M. (Eds.) **Mineral Nutrition and Plant Disease**. Saint Paul: APS Press, 2007. p.233-246.

FAUTEUX F.; RÉMUS-BOREAL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, n. 249, p. 1-6, 2005.

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

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, n.6, p. 664-666. 2005.

HOAGLAND, R.; ARNON I. The water culture method for growing plants without soil. **Circular of the California Agricultural Experiment Station**, n. 347, p. 1-32. 1950.

LEMES, E.M.; MACKOWIAK, C.L.; BLOUNT, A.; MAROIS, J.J.; WRIGHT, D.L.; COELHO, L.; DATNOFF, L.E. Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, v. 95, n.3, p.317-324. 2011.

LI, X.; ESKER, P.D.; PAN, Z.; DIAS, A.P.; XUE, L.; YANG, X.B. The uniqueness of the soybean rust pathosystem. **Plant Disease**, v. 94, n.7, p.796-806. 2010.

LIMA, L.M.; POZZA, E.D.; AZIZ, A.; POZZA, A.; FONSECA, T.A.P.S.; CARVALHO, J.G. Quantificação da ferrugem asiática e aspectos nutricionais de soja suprida com silício em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n.1, p.51-56. 2010.

REIS, E.M.; BRESOLIN, A.C.R.; CARMONA, M. **Doenças da soja I: Ferrugem asiática**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006. 48p.

RODRIGUES, F.A.; DUARTE, H.S.S.; DOMICIANO, G.P.; SOUZA, C.A.; KORNDORFER, G.H.; ZAMBOLIM, L. Foliar application of potassium silicate

reduces the intensity of soybean rust. **Australasian Plant Pathology**, n. 38, p. 366-372.2009.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677. 2005.

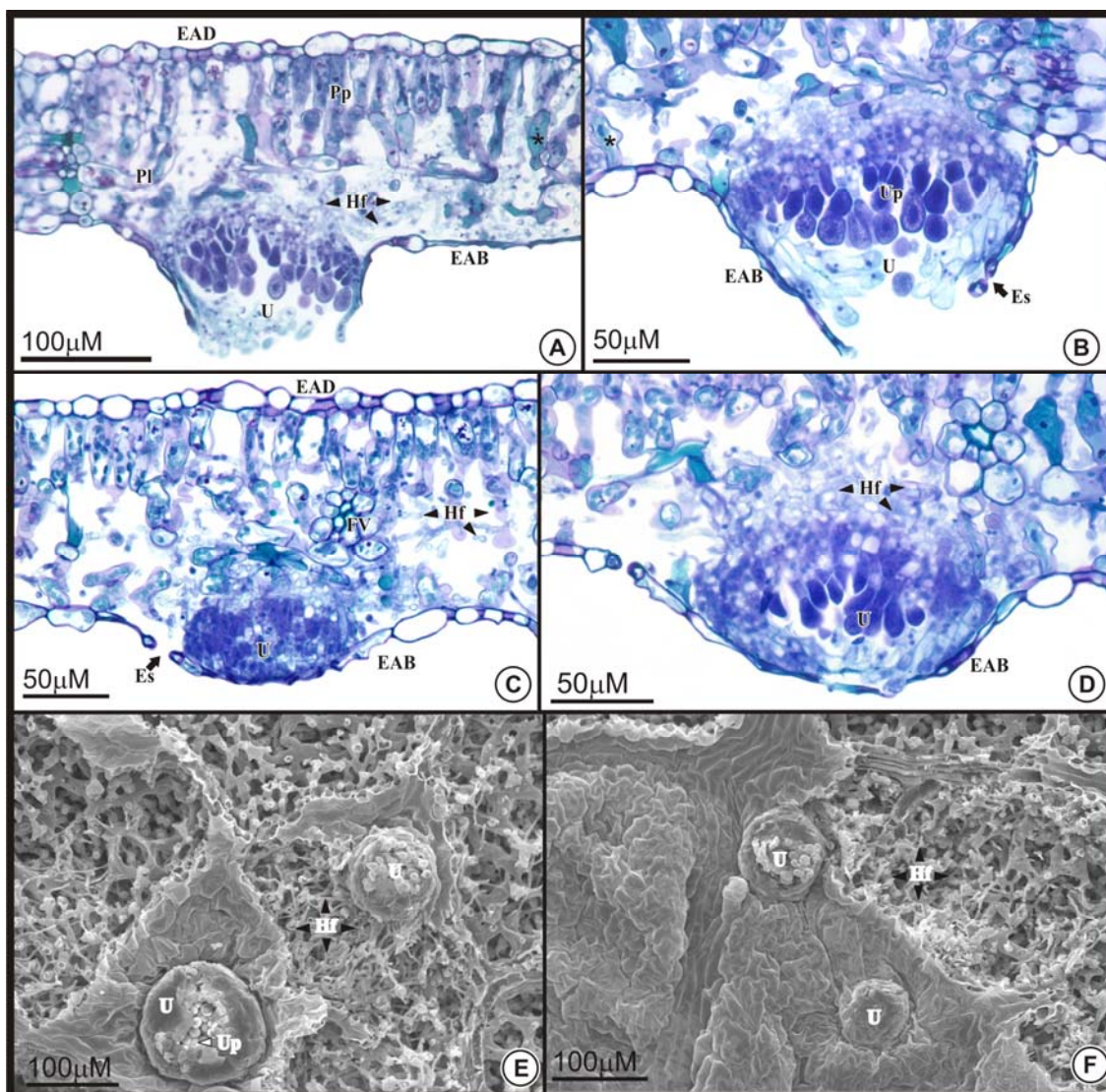


Figura 1. Micrografias de luz (A-D) e eletromicrografias de varredura (E e F) do processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja não supridas (A, B e E) ou supridas (C, D e F) com silício. EAD - epiderme adaxial, EAB - epiderme abaxial; Pp - parênquima paliçádico, Pl - parênquima lacunoso, Es - estômato, U - uredinia, Hf - hifas, Up – urediniósporos, * - célula de aspecto plasmolisado, FV- feixe vascular

Tabela 1. Número de lesões, de uredínias fechadas (não desenvolvidas) e de uredínias abertas (completamente desenvolvidas e liberando urediniosporos) em folíolos de plantas de soja não supridas (-Si) ou supridas (+Si) com silício (Si) aos 10 dias após inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*.

| Tratamentos | Lesões | Uredínias fechadas | Uredínias abertas |
|-------------|--------|--------------------|-------------------|
| -Si | 12,37 | 21,25 | 16,00 |
| +Si | 9,00 | 16,33 | 6,41 |
| Teste F | 9,51* | 6,75* | 89,98* |
| C.V. (%) | 30,95 | 32,34 | 26,39 |

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Expressão de genes de defesa na interação soja-*Phakopsora pachyrhizi* em resposta a acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico e silício em solo e em solução nutritiva

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é uma doença de difícil controle uma vez que os genes de resistência da planta são facilmente superados devido à variabilidade do patógeno. Nesses casos, o uso de indutores de resistência, juntamente com produtos à base de silício (Si) tem despontado como uma alternativa para o controle de doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico (AJ) e silicato de cálcio (SC) em solo e ácido monossilícico em solução nutritiva na expressão de seis genes de defesa (fenilalanina amônio liase - PAL, quitinase - QUI, chalcona isomerase - CHAL, lipoxigenase - LOX, PR1, metaloproteinase - MET) na interação soja-*P. pachyrhizi* às 12, 72 e 141 horas após a inoculação (hai) e na resposta de resistência da planta. As plantas do tratamento controle foram pulverizadas com água desionizada. Houve uma tendência de redução da expressão gênica em plantas inoculadas, quando comparadas às não inoculadas até às 72 hai. O maior nível de expressão dos genes ocorreu às 141 hai (início dos sintomas) para as plantas dos tratamentos ASM, AJ, SC e controle. Os genes PAL e CHAL apresentaram maior expressão nas plantas aspergidas com ASM. Nas plantas crescidas em solução nutritiva ocorreu a atenuação da expressão da maioria dos genes avaliados nas plantas supridas com Si e inoculadas, em relação às plantas não supridas com Si e inoculadas. Os genes mais expressos em plantas supridas com Si e inoculadas foram: CHAL e LOX às 12 hai, e PAL às 72 e 141 hai. O suprimento de SC em solo e a aspersão de ASM reduziram a severidade da FAS em 37% em relação às plantas dos tratamentos controle e aspergidas com AJ. Já o suprimento de Si em solução nutritiva resultou na redução de 60% da severidade da doença, quando comparado às plantas não supridas.

Palavras-chave: ferrugem asiática da soja, qRT-PCR, indução de resistência, *Glycine max*

ABSTRACT

Asian soybean rust (ASR) caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* is a difficult disease to control because the plant resistance genes are easily overcome due to the plasticity of the pathogen. In such cases, the use of resistance inducers, along with

products based on silicon (Si) has emerged as an alternative for disease control. The objective of this study was to investigate the effect of acibenzolar-S-methyl (ASM), jasmonic acid (JA) and calcium silicate (CS) in soil and monosilicic acid in nutrient solution on the expression of six defense genes (phenylalanine ammonia lyase - PAL, chitinase - CHI, chalcone isomerase - CHAL, lipoxygenase - LOX, PR1, metaloproteinase - MET) and plant resistance in the interaction soybean-*P.pachyrhizi* at 12, 72 and 141 hours after inoculation (hai). The control plants were sprayed with deionized water. There was a trend towards reduction of gene expression in inoculated plants compared to non-inoculated at 72 hai. The highest level of gene expression occurred at 141 hai (onset of symptoms) for plants treated with ASM, JA, CS and control plants. CHAL and PAL genes showed increased expression in plants sprayed with ASM. In plants grown in nutrient solution there was attenuation of expression of most genes tested in plants supplied with Si and inoculated, in relation to plants not supplied with Si and inoculated. The genes with the highest expression levels in plants supplied with Si and inoculated were: CHAL and LOX at 12 hai, and PAL at 72 and 141 hai. The supply of CS in the soil and spraying with ASM reduced the severity of ASR by 37% compared to the control and with plants treated with JA. The supply of Si in the nutrient solution resulted in a 60% reduction of disease severity.

Key words: Asian Soybean Rust, qRT-PCR, resistance induction, *Glycine max*

1. Introdução

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, agente causal da ferrugem asiática da soja, é um basidiomiceto biotrófico que possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo capaz de infectar pelo menos 42 espécies em 19 gêneros de leguminosas (Reis et al., 2006). O processo infeccioso tem início com a deposição do esporo assexual do fungo, denominado urediniósporo, sobre a superfície foliar. Em seguida, ocorre a germinação do esporo e a emissão do tubo germinativo (1 a 2 horas), seguidas da formação do apressório (Bonde et al., 1976). A penetração do fungo ocorre diretamente pela cutícula, ou através dos estômatos em torno de sete horas após a inoculação. Logo em seguida, há a formação de um cone apressorial dentro do apressório, o qual é contínuo com a parede celular da hifa de penetração. Após a penetração, as células da epiderme sofrem colapso e as hifas crescem através dessas células e preenchem o espaço intercelular; esse processo tem início cerca de 22 horas após a inoculação (hai) (Bonde et al., 1976). Em torno de 24 hai são formados os haustórios, mais frequentemente em células do mesofilo, epiderme superior e células vasculares

(McLean, 1979). A reprodução assexuada é completada quando a massa de micélio dá origem à uredinia, 5 a 8 dias após a inoculação (dai). Essa estrutura globosa erompe do mesofilo para a epiderme abaxial da folha, dentro da qual os uredosporos são diferenciados e, após a maturação, liberados para o ambiente, 8 a 10 dai, reiniciando o ciclo da doença (Marchetti et al., 1975; Reis et al., 2006).

A FAS foi inicialmente diagnosticada no Brasil no ano de 2001 no oeste e norte do Paraná. Na safra 2001-2002 a doença atingiu cerca de 60% da área plantada no estado e causou uma perda na produção estimada em 100 mil toneladas. Em 2003, a doença foi registrada em mais de 90% da área cultivada do Brasil com perdas significativas nos estados de Mato Grosso e Bahia (Yoriniori et al., 2003). A doença é caracterizada por redução da área fotossintética foliar e intensa desfolha, com consequente redução da qualidade e do número de vagens e grãos por planta. Dentre as medidas de controle da doença estão o uso de cultivares com algum grau de resistência; a aplicação do vazão sanitário; a eliminação de espécies hospedeiras e, em especial, a aplicação de fungicidas (Reis et al., 2006). Esta última prática é a mais utilizada, embora encareça a produção e provoque prejuízos ao ambiente.

Uma alternativa ao uso de fungicidas para o controle da doença é a aplicação de potencializadores ou indutores de resistência. Esses produtos funcionam como elicitores de uma resposta de defesa pela planta, podendo levar ao atraso ou mesmo evitar a penetração do patógeno no tecido do hospedeiro. Os indutores de resistência podem ser de origem abiótica ou biótica, desencadeando, respectivamente, a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI). A RSA é caracterizada pela ativação da rota do ácido salicílico, enquanto que na RSI ocorre ativação das rotas do ácido jasmônico e etileno (Dong, 1998; Reymond & Farmer et al., 1998; Durrant & Dong, 2004). Além desses indutores, a nutrição mineral com o uso de silício tem propiciado a redução da severidade de doenças como a brusone do arroz (Dallagnol et al., 2009), oídio em trigo (Rhémus-Boreal et al., 2005), antracnose em sorgo (Resende et al., 2009), antracnose em pepino (Liu et al., 2008), dentre outras. Embora a aplicação desses potencializadores seja eficiente no controle de algumas doenças, os eventos moleculares que permeiam a interação entre patógeno, hospedeiro e potencializador de resistência ainda não foram elucidados.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos indutores de resistência ácido jasmônico (AJ) e acibenzolar-S-metil (ASM) via aplicação foliar e silicato de cálcio (SC) em solo, e o efeito do suprimento com ácido monossilícico (Si) em solução nutritiva, na severidade final da ferrugem asiática da soja e na expressão de seis genes

relacionados à defesa no cultivar MG/BR 46 (Conquista) quando inoculado com *P. pachyrhizi*.

2. Material e métodos

2.1. Experimento 1

Para este estudo, utilizou-se solo deficiente em Si pertencente à classe Latossolo Amarelo Ácrico coletado na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Para o tratamento contendo Si, foi adicionado ao solo 1,7 g de silicato de cálcio (SC, AgroSilício[®], Harsco Minerais Ltda, Timóteo, MG) por kg de solo. Para os demais tratamentos, foi acrescentado ao solo deficiente em Si, 1,14 g de carbonato de cálcio e 0,3 g de carbonato de magnésio por kg de solo com o objetivo de equilibrar a quantidade de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) entre os tratamentos com a quantidade fornecida pelo SC. O solo foi incubado por 30 dias com umidade em torno de 65%. No momento da semeadura, todos os vasos receberam a aplicação de 1,67 g de fosfato de cálcio. Foram utilizadas sementes do cultivar de soja MG/BR 46 (Conquista) por ser altamente suscetível à FAS. As sementes foram desinfestadas em NaOCl 10% (v/v) por 5 min e, em seguida, lavadas em água esterilizada, secas em papel absorvente e semeadas em vasos contendo 2 kg de solo. As plantas foram regadas com água desionizada diariamente. Além disso, a partir dos 15 dias após emergência das plântulas, cada vaso recebeu 30 mL de solução nutritiva semanalmente (Hoagland & Arnon, 1950).

Os tratamentos utilizados foram: plantas crescidas em solo deficiente em Si e pulverizadas com: (i) água desionizada (controle), (ii) acibenzolar-S-metil (0,4 g/L) (Bion[®], 500 WG Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil) e (iii) ácido jasmônico (2 mM) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) 24 horas antes da inoculação com *P. pachyrhizi*. O quarto tratamento foi composto por plantas que cresceram em solo contendo SC. A água desionizada e as soluções de ASM, AJ e a água desionizada foram pulverizadas nas porções abaxial e adaxial das folhas de cada planta utilizando-se atomizador manual. Cada planta recebeu 25 mL de cada solução e água desionizada até o ponto de escoamento.

2.2. Experimento 2

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação sob temperatura controlada (28 ±4°C), em hidroponia, com constante aeração proporcionada por um compressor de ar. Oito dias após germinação as plântulas do cv. MG/BR 46 (Conquista) foram

transferidas para vasos plásticos contendo cada 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM, NH_4NO_3 1 mM, KNO_3 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, KCl 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, H_3BO_3 0,2 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{Na}_2\text{EDTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM. No tratamento controle, as plantas receberam apenas solução nutritiva. Para o tratamento com Si foram acrescidos 10% de ácido monossilícico a 2 mM para cada litro de solução nutritiva. O ácido monossilícico foi obtido pela passagem de silicato de potássio (4,5 mL/L) por uma resina de troca iônica (Amberlite[®], Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 5,8 e trocada por uma solução recém-preparada a cada três dias.

2.3. Obtenção do inóculo, inoculação e incubação das plantas

Para os experimentos 1 e 2 o inóculo foi obtido através da multiplicação prévia de um isolado monopostular de *P. pachyrhizi* multiplicado sob o cultivar MG/BR 46. Os urediniósporos foram armazenados em freezer -80 °C até o momento da inoculação. A dormência dos urediniósporos foi quebrada por 10 min a 40 °C em banho Maria, seguido por 24 horas de câmara úmida. Plantas de soja no estágio V6 (Fehr & Caviness, 1977) foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^5 urediniósporos/mL, com 89% de poder de germinação. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara de nevoeiro com temperatura de 24 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ por 24 h na ausência de luz. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 28 ± 4 °C e nebulização com duração de 1min a cada 30 min.

2.4. Avaliação da severidade da FAS

A severidade da FAS foi avaliada nas folhas V4, V5 e V6 (Fehr & Caviness, 1977) das plantas aos 18 dai, de acordo com a escala de notas proposta por Godoy et al. (2006).

2.5. Determinação da concentração foliar de Si

Após o término das avaliações, as folhas das plantas das repetições dos tratamentos controle e SC do experimento 1, e todas as folhas do experimento 2 foram coletadas, lavadas em água deionizada e secas a 65 °C durante 72 h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley com peneira de 40 mesh. A

concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica da digestão alcalina de 0,1 g de tecido seco (Korndörfer et al., 2004).

2.6. Coleta de material vegetal

Para a avaliação da expressão gênica, os folíolos V5 e V6 de cada planta foram marcados e coletados 12, 72 e 141 hai. Os folíolos foram, então, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até o seu processamento.

2.7. Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total das folhas de soja foi realizada com o reagente Brazol (LGC Biotecnologia Ltda, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada tratamento foram feitas três extrações individuais e independentes de amostras de 100 mg de folhas. Após extração, foi determinada a concentração de RNA total no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Rockland, DE, EUA) e a qualidade do RNA foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5%. A pureza foi determinada pela razão das absorvâncias a 260 nm e 280 nm. A seguir, o RNA total foi tratado com DNase RNase Free (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fornecedor. As amostras foram novamente quantificadas e avaliadas quanto à integridade, como descrito anteriormente. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total, utilizando a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o *primer* Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ (Sigma Aldrich, São Paulo, SP), de acordo com as recomendações dos fornecedores.

2.8. Análise dos genes para o qRT-PCR

Os genes utilizados no trabalho foram escolhidos de acordo com a literatura por estarem envolvidos na resposta de defesa da soja quando inoculada com *P. pachyrhizi*. As sequências de alguns primers foram obtidas da literatura, já os *primers* dos genes fenilalanina amônio liase e a porção ribossomal 18S de *Phakopsora pachyrhizi* (RUST), foram desenhados utilizando o software *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e confirmados de acordo com as seqüências depositadas no banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>) para a espécie *Glycine max*, ou no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para o genoma de *Phakopsora pachyrhizi*.

Os genes relacionados à resposta de defesa analisados foram: fenilalanina amônio liase (PAL), quitinase (QUI) (Nogueira, 2007), chalcona isomerase (CHAL) (Panthe et

al., 2007), lipoxigenase (LOX) (Brito Júnior, 2007), PR1(Nogueira, 2007) e metaloproteinase (MET) (Nogueira, 2007). Os pares de *primers* correspondentes estão listados na Tabela 1.

A quantificação relativa foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, uma modificação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak (2001), e o acúmulo dos transcritos de cada gene foi normalizada tomando como referência a expressão constitutiva dos genes *Cons7* (Libault et al., 2008) e *Ubiquitina-3* (Mortel et al., 2007).

Tabela 1. Lista de *primers* usados no q RT-PCR para a avaliação da expressão diferencial dos genes do cultivar MG/BR 46 (Conquista) submetido à inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*.

| Gene | Localização no Genoma da Soja ou identificação no Genbank | Primer forward 5'-3' | Primer reverse 5'-3' |
|--------------|---|------------------------|---------------------------|
| PAL | Glyma03g338901 | ACGGTTCATTTTGCTTGTC | ACCTGAGCGATGGTGAGAGT |
| QUI | Glyma02g048201 | TTCTTGCTCAAACCTTCATA | CCCACGCATATGGACCATCT |
| CHAL | Glyma20g385701 | GTTTCCCCTGCTTTGAAAGAGA | GGATTGGCCTCTAACTCTTTGAAG |
| LOX | Glyma13g423401 | ACAAGCTAGGCACAACAAAA | TTGTTCTCCGATGATTCCAA |
| PR1 | AF136636.1 | GCACTACACACAGGTCGTTTG | CCTCCGTTATCACATGTCACCTTG |
| MET | Glyma01g04350 | TGGGCTCTTCCCAGTGAAA | TTGCCGCACTCTCCAAGTC |
| RUST | EF560586.1 | ATCGAAGCCGGTATTTCTAAG | CCACTTGGTTGTGTCCATCTTAT |
| Cons 7 | IDAW310136 | ATGAATGACGGTCCCATGTA | GCATTAAGGCAGTCACTCT |
| Ubiquitina 3 | Glyma20g27950.1 | GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC | ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG |

As reações de amplificação continham 90 ng de cDNA, 10,0 µL de 2X SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e *primers* na concentração de 200 nM. As condições de amplificação foram: duas etapas iniciais (50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min) e 40 ciclos a 95 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. A curva de dissociação foi verificada após a amplificação para certificar que apenas um único *amplicon* havia sido produzido em cada reação. As reações de qPCR foram realizadas no termociclador SDS ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata.

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

Dois experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado para a avaliação da severidade e da expressão gênica. Para a avaliação da severidade, o experimento foi composto por quatro tratamentos com cinco repetições para o experimento 1, e dois tratamentos com cinco repetições para o experimento 2. Para as

análises de expressão gênica o experimento 1 foi instalado em esquema fatorial 4 x 2 com três repetições, os fatores estudados foram os dois indutores e o suprimento do solo com SC e plantas inoculadas ou não com *P. pachyrhizi*. Para o experimento 2 o esquema fatorial foi de 2 x 2 com três repetições, e os fatores estudados foram o suprimento ou não de Si na solução nutritiva, e plantas inoculadas ou não com o fungo. Para os dados de severidade procedeu-se a análise da variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade para o experimento 1. Para o experimento 2 procedeu-se à análise da variância, e as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. Para as análises da severidade dos experimentos 1 e 2, utilizou-se o pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 2003).

3. Resultados

Experimento 1

Na avaliação da severidade da doença em solo verificou-se maior controle da FAS nos tratamentos com ASM e SC, os quais reduziram a severidade em 32,2 e 35,7 % em relação ao controle. As plantas tratadas com AJ não diferiram significativamente do tratamento controle $P=0,05$ (Figura 1).

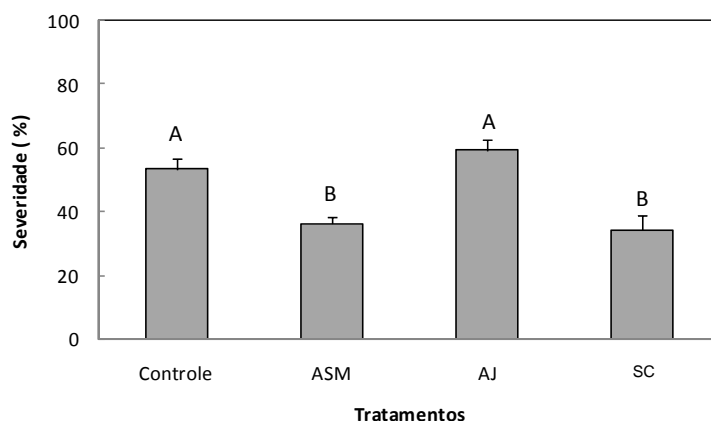


Figura 1. Severidade de FAS (%) no cultivar MG/BR 46 e folhas de plantas aspergidas com ASM (Acibenzolar-S-metil), AJ (ácido jasmônico), água desionizada (controle) e crescidas em solo suprido com SC (silicato de cálcio). Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A concentração de Si nas folhas das plantas de soja supridas com Si em solo foi significativamente maior (2,6 g/Kg) quando comparado a plantas do tratamento controle (0,6 g/Kg).

Às 12 hai o gene mais expresso foi MET, tanto nas plantas inoculadas quanto nas não inoculadas com o patógeno em todos os tratamentos (**Fig. 2ab**). A expressão do gene MET ao longo do tempo avaliado aumentou de 2 a 32 x mais do que a do gene endógeno. O gene LOX foi o mais expresso nas plantas não inoculadas, em especial nas plantas aspergidas com AJ (**Fig. 2a**). Para as plantas aspergidas com ASM, a expressão dos genes QUI, CHAL e PAL nas plantas inoculadas foi maior do que nas plantas não inoculadas. Para as plantas aspergidas com AJ houve maior expressão dos genes CHAL, QUI e MET nas plantas inoculadas quando comparadas às plantas não inoculadas. Para as plantas crescidas em solo suprido com SC houve uma tendência de redução da expressão dos genes PR1, QUI, CHAL e PAL nas plantas inoculadas, quando comparadas às não inoculadas. Para as plantas aspergidas com água desionizada e inoculadas com *P. pachyrhizi* houve um pequeno aumento da expressão dos genes CHAL e PAL (**Fig. 2ab**).

Às 72 hai ocorreu uma tendência de redução na expressão dos genes LOX e QUI nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas de todos os tratamentos (**Fig. 2cd**). Além da redução da expressão desses genes ocorreu redução da expressão do gene MET e aumento da expressão de PAL nas plantas inoculadas aspergidas com ASM quando comparadas às plantas não inoculadas. Para as plantas aspergidas com AJ e inoculadas ocorreu a redução da expressão do gene MET e um pequeno aumento na expressão dos genes CHAL e PAL quando comparada as plantas inoculadas. Para as plantas crescidas em solo suprido com SC ocorreu o aumento da expressão dos genes MET e CHAL nas plantas inoculadas. Para as plantas aspergidas com água desionizada não houve diferença na expressão dos demais genes para plantas inoculadas e não inoculadas (**Fig. 2cd**).

Às 141 hai houve o aumento da expressão da maioria dos genes nas plantas inoculadas quando comparadas às não inoculadas (**Fig. 2ef**). Para as plantas aspergidas com ASM e inoculadas houve aumento da expressão dos genes MET, LOX, QUI e CHAL quando comparada a expressão das plantas não inoculadas. Para as plantas aspergidas com AJ houve aumento da expressão dos genes PR1 e QUI nas plantas inoculadas em relação as não inoculadas. Para as plantas supridas com SC houve aumento da expressão dos genes PR1, QUI e PAL nas plantas inoculadas. Nas plantas do tratamento controle (pulverizadas com água destilada) inoculadas ocorreu aumento

da expressão dos genes MET, PR1 e QUI quando comparado as plantas não inoculadas. A expressão do gene marcador do patógeno (RUST) foi maior no tratamento com AJ (1,4) e menor no tratamento com SC (0,1), já para ASM e o controle os valores foram 0,6 e 0,5 (Fig. 2ef).

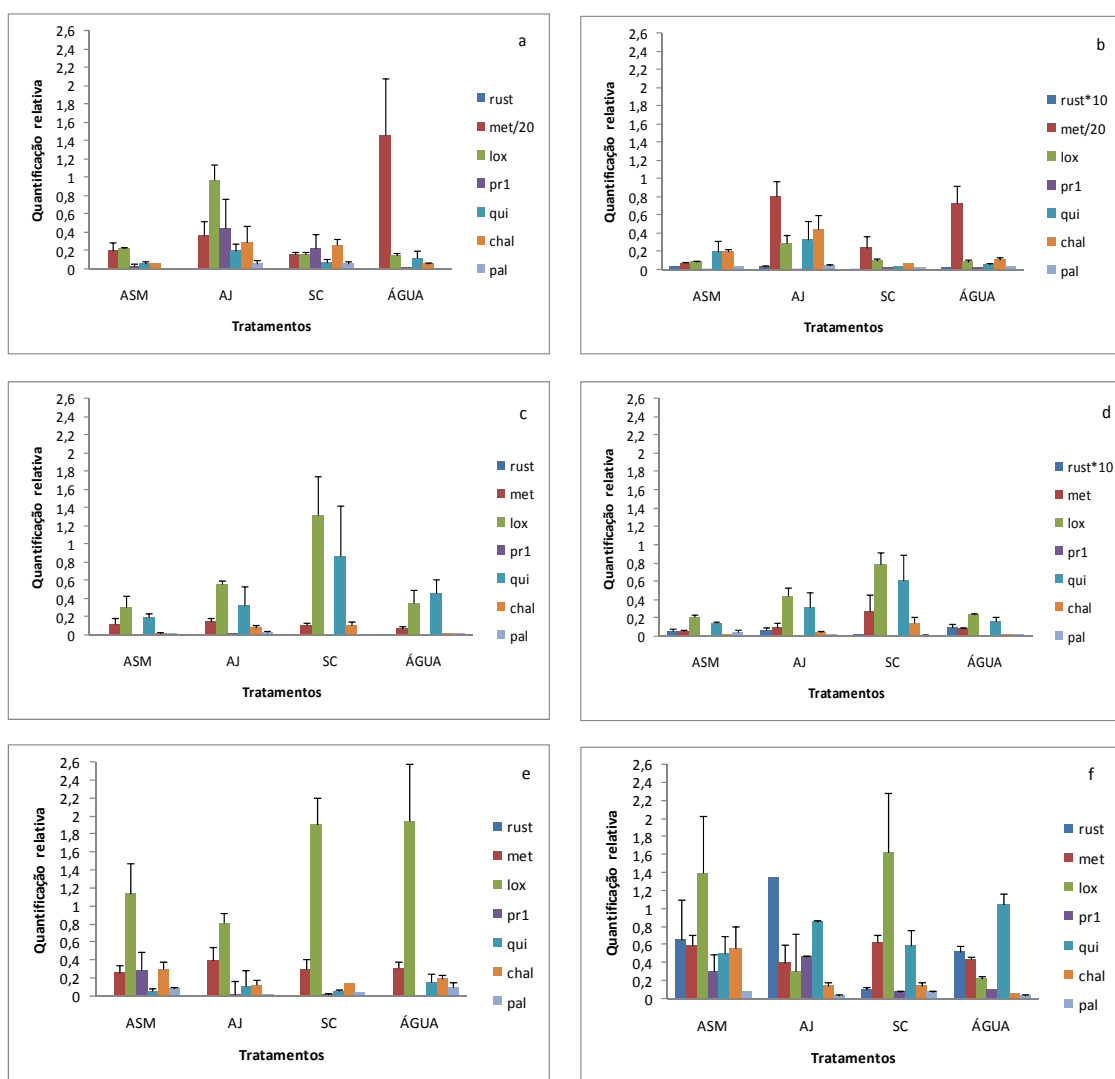


Figura 2. Quantificação relativa da expressão de genes de defesa em plantas do cultivar MG/BR 46 submetidas aos tratamentos ASM, AJ, SC e controle inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*. **a-b:** 12 horas após a inoculação (hai); **c-d:** 72 hai; **e-f:** 141hai. Plantas não inoculadas a, c, e. Plantas inoculadas b, d, f.

Experimento 2

Houve diferença significativa ($P=0,05$) quanto à severidade da FAS entre as plantas supridas com silício (+Si) e as não supridas (-Si). As plantas +Si apresentaram, em média, uma redução de 60% na severidade da doença, quando comparadas às plantas -Si (Tab. 2).

Tabela 2. Severidade de FAS (%) em plantas do cultivar MG/BR 46 não supridas (-) e supridas (+) com silício (Si) em solução nutritiva. Médias comparadas pelo teste *F* a 5% de probabilidade.

| Tratamentos | Severidade |
|-------------|------------|
| -Si | 35 |
| +Si | 14 |
| test F | 61,54* |
| C.V. (%) | 36 |

c.v.= coeficiente de variação

Em relação ao acúmulo de Si nas folhas das plantas de soja supridas com Si em solução nutritiva, observou-se uma concentração de 8,7 g/Kg de Si nessas plantas quando comparado a plantas do tratamento controle não supridas com Si, que foi de 3,6 g/Kg.

Às 12 hai (**Fig. 3a**) as plantas que cresceram em presença de silício e não inoculadas (+SiNI) apresentaram menor expressão dos genes MET, LOX, CHAL e PAL comparadas às plantas não supridas com silício e não inoculadas (-Si NI). As plantas não supridas com silício e inoculadas (-SiI) apresentaram maior expressão dos genes PR1, QUI, CHAL e PAL quando comparadas às plantas não supridas com silício e inoculadas (-SiNI). Quando se compara a expressão dos genes das plantas do tratamento +SiNI com os das plantas do tratamento +SiI, observa-se a redução da expressão dos genes LOX, QUI, CHAL e PAL nas plantas +SiI. Já quando se compara a expressão das plantas dos tratamentos -SiI com as plantas do tratamentos +SiI, verifica-se maior expressão dos genes avaliados nas plantas -Si, com exceção dos genes LOX e CHAL (**Fig. 3a**). Ocorreu uma tendência de atenuação da expressão dos genes avaliados nas plantas supridas com Si.

Às 72 hai (**Fig. 3b**) verificou-se menor expressão dos genes LOX, CHAL e PAL nas plantas supridas com Si e não inoculadas em relação às plantas não supridas com Si e não inoculadas. Houve redução da expressão dos genes MET, LOX e PAL nas plantas inoculadas não supridas com Si em relação as não inoculadas (-SiNI). Ocorreu aumento da expressão dos genes LOX, QUI, CHAL e PAL nas plantas supridas com SI e inoculadas em relação às plantas não inoculadas (+SiNI). Quando se compara a expressão dos genes das plantas inoculadas observa-se o aumento da expressão de MET e PAL nas plantas supridas com Si em relação às não supridas (**Fig.3b**).

Às 141 hai (**Fig. 3c**) ocorreu o aumento da expressão dos genes MET, PR1, QUI e CHAL (superior a 100%) nas plantas não supridas com Si e inoculadas em relação às plantas não inoculadas (-SiNI). Para as plantas supridas com Si e inoculadas ocorreu aumento da expressão dos genes QUI, CHAL e PAL em relação as plantas não inoculadas (+SiNI). Quando se compara a expressão dos genes entre as plantas inoculadas observa-se a maior expressão dos genes do patógeno (RUST), além dos genes MET, LOX, PR1, QUI e CHAL nas plantas não supridas com Si (**Fig.3c**).

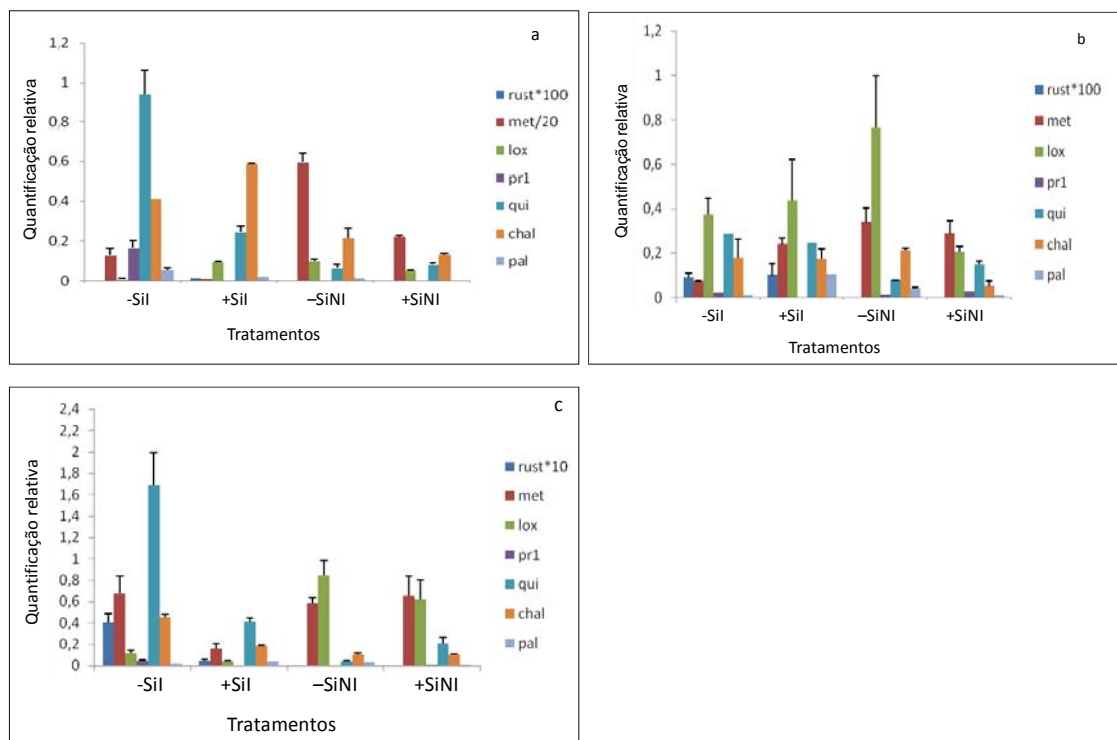


Figura 3. Quantificação relativa da expressão de genes de defesa em plantas do cultivar MG/BR 46 supridas (+Si) e não supridas com silício (-Si) inoculadas (I) e não inoculadas (NI) com *Phakopsora pachyrhizi*. **a-** 12 horas após a inoculação (hai); **b-** 72 hai; **c-** 141hai.

4. Discussão

Trabalhos sobre a análise da expressão gênica no patossistema soja-*P. pachyrhizi* foram realizados por vários pesquisadores (Mortel et al., 2007, Panthee et al., 2009, Tremblay et al., 2010), no entanto, o presente estudo é o primeiro a avaliar a influência da aplicação de indutores de resistência e silício na expressão dos genes de defesa da soja ao longo do processo infeccioso.

A eficiência na redução dos sintomas da FAS com a aplicação de ASM e utilização de solo suprido com SC para o crescimento das plantas corroboram os dados

da literatura para este patossistema (Pereira et al., 2009, Rodrigues et al., 2009, Lemes et al., 2011). A redução da severidade da FAS com o uso de SC no solo e de Si em solução nutritiva pode ser relacionado ao acúmulo de Si nas folhas amostradas, pois essa translocação do mineral das raízes para a folha pode servir como uma barreira à penetração e/ou a colonização pelo fungo, como ocorre com o arroz quando suprido com Si (Yoshida, 1962, Kim et al., 2004).

Mortel et al. (2007), trabalhando com o patossistema soja-*P. pachyrhizi*, verificaram a existência de uma resposta bifásica dos genes da soja, com um pico de expressão nas primeiras 12 hai nos genótipos resistente e suscetível à FAS, e um segundo pico de expressão diferencial, iniciada no genótipo resistente às 72 hai, e no genótipo suscetível às 96 hai. No entanto, no presente experimento, não foi observada resposta bifásica dos genes de defesa analisados no cultivar suscetível MG/BR 46 tratado com indutores de resistência e Si. Porém, foi verificada a redução da expressão de todos os genes avaliados às 72 hai e o aumento da expressão às 141 hai, momento em que foram visualizados os primeiros sintomas da doença.

O uso de diferentes potencializadores de resistência permitiu inferir que o modo de ação dos mesmos é diferenciado, com base nas avaliações da expressão dos genes de defesa ao longo do tempo amostrado e dos dados da severidade final da doença. Verificou-se uma maior expressão dos genes nas plantas aspergidas com AJ em 12 e 141 hai, em relação aos outros tratamentos. Porém, não houve diferença significativa quanto aos dados de severidade para as plantas aspergidas com AJ e as plantas do tratamento controle. Já as plantas supridas com SC apresentaram um aumento gradual da expressão dos genes, diferentemente das plantas aspergidas com ASM, que apresentaram maior expressão dos genes analisados às 141 hai. No entanto, não houve diferença significativa para a severidade nas plantas aspergidas com ASM e supridas com SC. Vários mecanismos que previnem o ingresso e a progressão de organismos patogênicos podem ser induzidos em plantas, e a exposição a pré-tratamentos como os indutores de resistência pode estimular a indução da resistência local ou sistêmica, reduzindo a severidade da doença. Durante este processo, o reconhecimento do patógeno ativa uma cascata de sinalização que leva à expressão de genes associados com a resposta de defesa (Métraux, 2007).

No presente experimento ocorreu uma tendência de aumento da expressão dos genes CHAL e/ ou PAL em plantas supridas com SC em solo, silício em solução nutritiva e aspergidas com ASM. Ou seja, a redução da severidade da doença pode estar intimamente ligada ao aumento da expressão desses genes nas plantas tratadas, pois os

compostos fenilpropanóis desempenham funções importantes na defesa das plantas ao ataque de patógenos na forma de moléculas sinalizadoras, como fitoantecipinas e fitoalexinas (Dixon et al., 2002, Naoumkina et al., 2010). A PAL é a primeira enzima da rota dos fenilpropanóis que como produto final pode dar origem, entre outros compostos, à lignina, que pode ser depositada na parede das células vegetais garantindo maior resistência à penetração e colonização de patógenos. Nesta mesma rota encontra-se a enzima CHAL que catalisa a isomerização estereoespecífica das chalconas em seus flavonóides correspondentes, que dentre outras funções apresentam atividades antimicrobianas (Shimada et al., 2003).

A expressão tanto de MET, um marcador para resistência sistêmica induzida (Nogueira et al., 2007), quanto de PR1, um marcador da resistência sistêmica adquirida, foi verificada nas plantas de todos os tratamentos. Ou seja, ambas as rotas foram ativadas, porém a eficiência em reduzir os sintomas da FAS foi verificada nas plantas dos tratamentos ASM. Esses dados corroboram as observações feitas por Makandar et al. (2010), que verificaram que plantas de trigo e *Arabidopsis* que super-expressavam o gene NPR1 (gene que regula a sinalização de AS e modula a ativação de defesa dependente de AJ) tiveram a resistência aumentada contra *Fusarium graminearum*. A aplicação de AS aumentou a resistência à doença e ativou a rota da resistência sistêmica induzida. Porém, o nível de resistência foi maior em plantas mutantes para a rota do AJ, indicando que esta via contribui para a suscetibilidade da planta por atenuar a ativação da sinalização do AS em plantas inoculadas com *F. graminearum*. O antagonismo entre ASM e AJ também foi verificado por Liu et al. (2008), em plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum orbiculare*. O tratamento com ASM levou à acumulação de quitinase classe III em folhas e suprimiu a formação de lesões. Em contraste, o tratamento com AJ suprimiu completamente a expressão das quitinases, tornando a planta suscetível.

A aplicação de SC no solo também foi eficiente em reduzir a severidade de FAS, porém, a forma pela qual o silício leva à redução da severidade nesse patossistema não é ainda conhecida. No presente experimento, com a aplicação de SC, verificou-se um gradual aumento da expressão dos genes de defesa, paralelamente à expressão do gene marcador para o patógeno. A expressão dos genes de defesa nas plantas inoculadas e supridas com SC foi menor do que nas plantas inoculadas e aspergidas com ASM, AJ e água destilada, nos quais também foi verificada uma maior expressão do gene marcador de *P. pachyrhizi*. Ocorreu, ainda, a diminuição da expressão dos genes de defesa nas plantas supridas com SC e inoculadas, quando comparadas às plantas supridas com SC

e não inoculadas. Este fato também foi verificado nos patossistemas trigo-*Blumeria* (Fauteux et al., 2006) e *Arabidopsis- Blumeria* (Chain et al. 2009).

Para confirmar os dados de expressão e severidade em plantas supridas com Si em solo, realizou-se o experimento em solução nutritiva que, a princípio, deve garantir a maior disponibilidade de Si às plantas de soja. Este fato foi confirmado pelo maior acúmulo de Si nas folhas das plantas cultivadas em hidroponia (8,7 g/kg) do que nas plantas cultivadas em solo (2,6 g/kg). Neste experimento foi evidenciada a menor expressão dos genes de defesa nas plantas supridas com Si e inoculadas (+SiI) em relação às plantas não supridas com Si e inoculadas (-SiI) para a maioria dos genes às 12 e 141 hai. No entanto, as plantas +Si apresentaram redução de 60% da severidade da doença quando comparadas às plantas -Si. Esses dados corroboram os dados obtidos por Fauteux et al. (2006) que verificaram a diminuição da expressão dos genes de defesa em plantas de *Arabidopsis* supridas com Si e inoculadas com *Erysiphe cichoracearum*. Para esses autores, a aplicação de Si em plantas não inoculadas alterou a expressão de apenas 2 genes em um total de 40,000 transcritos avaliados.

No caso do trigo, Chain et al. (2009) observaram em plantas não supridas com Si e inoculadas com *Blumeria graminis* a alteração da expressão de 518 genes, já nas plantas supridas com Si e inoculadas houve a alteração da expressão de 699 genes, com a sua maioria sendo *dow* regulados (685). Quando se compara a expressão dos genes nas plantas supridas com Si e inoculadas, com a expressão das plantas supridas com Si e não inoculadas, parece que o tratamento com Si diminuiu o impacto negativo da inoculação, pois apenas 81 genes foram regulados quando as plantas foram inicialmente supridas com Si. Isto indica que o Si interfere na expressão de genes em plantas infectadas pelo patógeno. Plantas supridas com Si e não inoculadas apresentaram alteração na expressão de apenas 47 genes de um total de 55.052 genes, dessa forma os autores sugerem que os benefícios do Si são mais evidentes sob condições de estresse.

Ao contrário do que ocorreu no presente trabalho com soja, e nos trabalhos de Fauteux et al. (2006) com *Arabidopsis* e Chain et al. (2009) com trigo, o suprimento de Si em plantas de arroz não desafiadas por patógeno resulta na regulação diferencial de 221 genes, demonstrando que o Si tem efeito sobre o metabolismo do arroz, e não apenas uma função passiva na resistência. E quando se compara o número de genes expressos em plantas controle e plantas supridas com Si e desafiadas com *Pyricularia grisea*, observa-se a regulação de 60% a menos de genes (Brunings et al., 2009).

De acordo com os dados apresentados neste estudo com indutores de resistência e Si em solo e solução nutritiva é possível evidenciar que há expressão diferencial dos

genes de resistência ao longo do processo infeccioso da FAS conforme o indutor utilizado. Porém, observou-se que na presença de AJ apesar de ocorrer o aumento na expressão de genes de defesa, as plantas apresentaram sintomas de suscetibilidade.

Desta forma, os resultados encontrados no presente experimento abrem caminhos para novas investigações nesse patossistema, permitindo levantar os seguintes questionamentos: 1) quais são os eventos pós-transcricionais e qual é a importância dos mesmos para a redução da severidade da ferrugem em plantas que recebem a aplicação de indutores?; 2) além dos genes utilizados neste experimento, que outros genes poderiam explicar a redução da severidade propiciada pela aplicação de ASM e Si em soja?; 3) quais são as rotas que realmente estão sendo ativadas ou reprimidas em presença dos diferentes indutores?; 4) quais são as proteínas que estão sendo produzidas?; 5) quais são os metabólitos que estão sendo produzidos, e qual é a importância destes para as respostas de resistência e suscetibilidade encontradas?

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor. Ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa dos professores F.A. Rodrigues, M.A. Moreira e E.G. Barros. Os autores agradecem às empresas Syngenta Proteção de cultivos Ltda e a empresa Harsco Minerais Ltda pelo fornecimento do Bion[®] e do AgroSilício[®], respectivamente.

Referências Bibliográficas

- Bonde, M.R., Melching, J.S. and Bromfield, K.R.** (1976) Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *Phytopathology*. **66**, 1290-1294.
- Brito Júnior, S.L.** *Análise da expressão gênica induzida por Phakopsora pachyrhizi em soja*. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- Brunings, A.M., Datnoff, L.E., Ma J.F., Mitani, N., Nagamura, Y., Rathinasabapathi, B. and Kirst, M.** (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol*. **155**, 161-170.

- Chain, F., Côté-Beaulieu C., Belzile, F., Menzies, J.G. and Bélanger, R.** (2009) A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Mol Plant-Microbe Interact.* **22**, 1323-1330.
- Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.Á., Mielli, M.V.B., Ma, J.F., and Datnoff, L.E.** (2009). Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology.* **99**, 116-121.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S. and Wang, L.** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 371-390.
- Dong X.** (1998) AS, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Durrant W.E. and Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. of Phythopathol.* **42**, 185-209.
- Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J.G., and Bélanger, R.R.** (2006) The protective role silicon in the *Arabidopsis*- powdery mildew pathosystem. *PNAS.* **103**, 17554-17559.
- Fehr, W.R. and Caviness, C.E.** (1977) Stages of soybean development. Ames: Iowa State University Press. (Special report 80).
- Godoy, C.V., Koga, L.J., and Canteri, M.G.** (2006) Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatol. Bras.* **31**, 63-68.
- Hoagland, R. and Arnon I.** (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Stn Circ.* **347**, 1-32.
- Kim S.G., Kim K.W., Park E.W., and Choi D.** (2004) Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology.* **92**, 1095-1103.
- Korndörfer G.H., Pereira H.S., and Nolla A.** (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia. Boletim Técnico 2.
- Lemes, E.M., Mackowiak, C.L., Blount, A., Marois, J.J., Wright, D.L., Coelho, L., and Datnoff, L.E.** (2011) Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. *Plant Dis.* **95**, 317- 324.
- Libault M., Thibivilliers, S., Bilgin, D.D., Radwan, O., Benitez, M., Clough, S.J., and Stacey, G.** (2008) Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *The plant genome.* **1**, 44-54.

- Liu C., Ruan Y., Lin Z., Wei R., Peng Q., Guan C., and Ishii H.** (2008) Antagonism between acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. *Physiol Mol Plant Pathol.* **72**,141-145.
- Livak K.J.** (2001) Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. *Methods.* **25**,402-408.
- Makandar R., Nalam V., Chaturvedi R., Jeannotte R., Sparks A.A., and Shah J.** (2010) Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 861-870.
- Marchetti, M.A., Uecker, F.A., and Bromfield, K.R.** (1975) Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. *Phytopathology.* **65**, 822-823.
- McLean R.J.** (1979) Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Aust. J. Agric. Resp.* **30**, 77-84.
- Métraux, J.** (2007) Induced defenses in plants. In: Indução de Resistência em plantas a patógenos (Rodrigues, F.A. e Romeiro, R.S), pp. 7- 24, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Mortel, M., Recknor, J.C., Graham, M.A., Nettleton, D., Dittman, J.D., Nelson, R.T., Godoy, C.V., Abdelnoor, R.V., Almeida, A.M.R., Baum, T.J., and Whitham, S.A.** (2007) Distinct biophasic mRNA changes in response to Asian Soybean Rust infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 887-899.
- Naoumkina, M.A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Xinbin, D., Zhao, P.X., and Dixon, R.A.** (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol Plant Pathol.* **11**, 829-846.
- Nogueira, S.R.** *Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação soja- Phakopsora pachyrhizi.* 2007. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- Panthee, D.R., Yuan, J.S., Wright, D.L., Marois, J.J., Mailhot, D., and Stewart Jr, C.N.** (2007) Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian sybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage-specific. *Funct Integr Genomics.* **7**, 291-301.
- Panthee, D.R., Marois, J.J., Wright, D.L., Narvárez, D., Yuan, J.S., and Stewart Jr, C.N.** (2009) Differential expression of genes in soybean in response to causal agent of Asian sybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. *Theor Appl Genet.* **118**, 359-370

- Pereira, S.C., Rodrigues, F.A., Carré-Missio V, Oliveira M.G.A., and Zambolim L.** (2009) Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Trop Plant Pathol.* **34**, 164-170.
- Reis, E.M., Bresolin, A.C.R., and Carmona, M.** (2006) Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo.
- Resende, R.S., Rodrigues, F.A., Soares, J.M., and Casela, C.R.** (2009) Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *Eur J Plant Pathol.* **124**, 533-541.
- Reymond P., and Farmer E.E.** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Rhémus-Boreal W., Menzies J.G., and Bélanger R.R.** (2005) Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiol Mol Plant Pathol.* **66**, 108–115.
- Rodrigues F.A, Duarte H.S.S., Domiciano G.P., Souza C.A., Korndörfer G.H., and Zambolim L.** (2009) Foliar application of potassium silicate on the control of soybean rust. *Australas Plant Pathol.* **38**, 366-372.
- Shimada, N., Aoki, T., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S. and Ayabe, S.** (2003) A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy (iso) flavonoids in *Lotus japonicas*. *Plant Physiol.* **131**, 941-951.
- Tremblay A., Hosseini P., Alkharouf N.W., Li S., and Matthews B.F.** (2010) Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Plant Science.* **179**, 183-193.
- Yorinori J.T., Paiva W.M., Frederick R. D., Costamilan L. M., Bertagnolli P. F., Hartman G. E., Godoy C. V., and Nunes Júnior. J.** (2003) Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Dis.* **89**,675-677.
- Yoshida S., Ohinishi Y., and Kitagishi K.** (1962) Chemical forms, mobility, and deposition of silicon in the rice plant. *Jpn J Soil Sci Plant Nutr.* **8**, 107-111.

Resistance inducers and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction²

M. F. A. CRUZ^a, F. Á. RODRIGUES^b, E. R. POLANCO^b, C. R. S. CURVÊLO^b, K. J. T. NASCIMENTO^b, M. A. MOREIRA^c, and E. G. BARROS^{a*}

^aDepartamento de Biologia Geral, ^bDepartamento de Fitopatologia, ^cDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil (*E-mail: ebarros@ufv.br)

Abstract

The main goal of the present work was to determine the influence of the resistance inducers jasmonic acid (JA), acibenzolar-S-methyl (ASM) and calcium silicate (CS) on the activity of defense enzymes chitinase (CHI), glucanase (GLU) peroxidase (POX), polyphenol-oxidase (PPO) and phenylalanine-ammonia lyase (PAL) in the pathosystem soybean-*Phakopsora pachyrhizi* at 24, 48, 72 and 141 hours after inoculation (hai). Asian soybean rust (ASR) severity was significantly lower on plants sprayed with ASM and supplied with Si compared to control plants and plants treated with JA. ASM and CS decreased soybean rust severity by 32.2 and 35.7%, respectively. There was an increase on the activity of CHI at 141 hai on plants supplied with Si, and also on the activities of GLU and PAL at 72 and 141hai on plants sprayed with ASM. No relationship could be established between the activity of POX and PPO and resistance to ASR. CS and ASM were efficient to reduce ASR severity through the activation to defense enzymes.

KeyWords: *Glycine max*, asian soybean rust, biochemical resistance

Introduction

Asian soybean rust (ASR), caused by *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the most destructive diseases of soybean (Sinclair & Hartman, 1999). The symptoms of this disease begin as chlorosis of polygonal shape in the leaves delimited by the veins and evolve later to brown lesions (Sinclair & Hartman, 1999). In plant leaves of susceptible cultivars, numerous urediniospores containing uredia arise in these lesions (Reis *et al.*, 2006). ASR is a difficult disease to control due to the high aggressiveness of the pathogen and the absence so far of cultivars with satisfactory resistance levels

² Artigo submetido à Revista Journal of Phytopathology

(Yamanaka *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2007). The greatest damage caused by the disease are attributed to early defoliation of plants (Li *et al.*, 2010), so there is a reduction in the number of pods, number of grains per pod and weight of grains (Ogle *et al.*, 1979). Losses in 2001/2002 reached 100,000 tons when the ASR was first detected in Brazil. During the 2003/2004 crop in Mato Grosso do Sul and Bahia states, losses reached 2.2 million tons (Yorinori *et al.*, 2003). Currently, ASR is controlled by fungicides, including preventively, which greatly increases production costs (Yorinori *et al.*, 2003). The use of resistance inducers and potentiators, such as products containing silicon (Si), can become an efficient alternative to reduce the damage caused by pathogens in crops of great economic importance (Liu *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Datnoff *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009).

During induced resistance mediated by jasmonic acid (JA), ethylene (ET), salicylic acid (SA) or biotic agents such as plant-growth-promoting bacteria, activation of numerous defense mechanisms occurs when the plants are infected by pathogens (Dong, 1998). The activation of defense mechanisms using JA, ET and SA has been confirmed for *Cucumis sativus* (Liu *et al.*, 2008), *Oryza sativa* (Schweizer *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Luo *et al.*, 2011), *Lycopersicon esculentum* and *Nicotiana tabacum* (Achoo *et al.*, 2004) and *Solanum tuberosum* (Halim *et al.*, 2007).

The use of Si can reduce the severity of many diseases in many plant species, mainly because it is involved in the potentiation of multiple defense mechanisms (Datnoff *et al.*, 2007). It is believed that Si acts as a physical barrier after being deposited under the cuticle, resulting in a cuticle-Si double layer (Yoshida *et al.*, 1962), which prevents or delays the penetration of pathogens and thereby prolongs the incubation period and even the latent period (Resende *et al.*, 2009; Dallagnol *et al.*, 2009). Moreover, in the presence of Si, plants infected by pathogens present, in general, increased production of phenolics and phytoalexins (Fawe *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2004), increased activity of chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase, and increased transcription of genes encoding β -1,3-glucanase, peroxidase and PR-1 (Rodrigues *et al.*, 2005). In field experiments, foliar applications of potassium silicate reduce severity of ASR (Rodrigues *et al.*, 2009; Lemes *et al.*, 2011). However, information in the literature regarding the use of resistance potentiators in soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction, particularly at the biochemical level, are still scarce.

The objective of this study was to determine the effect of resistance inducers, including Si, on the activity of defense enzymes chitinase, β -1,3-glucanases,

peroxidases, polyphenol oxidases and phenylalanine ammonia-lyase in soybean plants infected by *P. pachyrhizi*.

Materials and Methods

Growth of soybean plants and treatments

For this study, Si-deficient soil of the Acric Yellow Latosol class collected in the Triangulo Mineiro region, in Minas Gerais state, was used. For the treatment containing Si, 1.7 g of calcium silicate (CS) (AgroSilício®, Harsco Minerais Ltda, Timoteo, MG) per kg soil was used. For the other treatments, 1.14 g of calcium carbonate and 0.3 g of magnesium carbonate were added per kg of the soil deficient in Si, in order to balance the amount of calcium (Ca) and magnesium (Mg) between treatments with the amount provided by the SC. The soil was incubated for 30 days with humidity around 65%. At the time of sowing, all pots received application of 1.67 g of calcium phosphate. Seeds of ASR susceptible soybean cultivar MG/BR 46 (Conquista) were used. They were sterilized in 10% NaOCl (v/v) for 5 min and then washed in sterile water, dried on absorbent paper and sown in pots containing 2 kg of soil. At 15 days after seedling emergence, they received 30 mL of nutrient solution weekly (Hoagland & Arnon, 1950). Plants were watered daily with deionized water.

The treatments were: plants grown in soil deficient in Si and sprayed with: (i) deionized water (control), (ii) acibenzolar-S-methyl (ASM) (0.4 g/L)(Bion®, 500 WG Syngenta Crop Protection Inc., São Paulo, Brazil) and (iii) jasmonic acid (JA) (2 mM) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) 24 h before inoculation with *P. pachyrhizi*. The fourth treatment consisted of plants grown in soil containing CS. Solutions containing ASM, JA or deionized water were sprayed on the abaxial and adaxial portions of the leaves of each plant using a manual atomizer. Each plant received 25 mL of each solution to the point of runoff.

Preparation of inoculum and inoculation of plants with *P. pachyrhizi*

Soybean plants at stage V6 (Fehr & Caviness, 1977) were inoculated with a suspension of urediniospores of a monopustular isolate of *P. pachyrhizi* at concentration of 1×10^5 urediniospores/mL. The isolate was previously multiplied in plants of the cultivar MG/BR 46 (Conquista). Urediniospores percentage germination was 89%. After inoculation, the plants remained in a mist chamber at a temperature of 24 ± 2 °C and relative humidity of $90 \pm 5\%$ for 24 h in the absence of light. After this period,

plants were transferred to a greenhouse with a temperature of 26 ± 4 °C and sprayed for 1 min every 30 min.

Assessment of ASR severity

ASR severity was evaluated in the leaflets V4, V5, and V6 (Fehr & Caviness, 1977) of plant replicates of each treatment, 18 days after inoculation (dai) according to the symptom scale proposed by Godoy *et al.* (2006).

Determination of Si concentration in leaves

Upon completion of the experiments, the leaves of control plants and supplied CS plants were collected, washed with deionized water and dried at 65 °C for 72 h. Later, the leaves were ground in a Thomas-Wiley type mill with 40 mesh sieve. The leaf concentration of Si was determined by colorimetric analysis of the alkaline digestion of 0.1 g of dry tissue (Korndörfer *et al.*, 2004).

Determination of the activities of chitinase (CHI, EC 3.2.1.14), β -1,3-glucanase (GLU, EC 3.2.1.39), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), polyphenol oxidases (PPO, EC 1.10.3.1) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5)

The trifoliate leaves at stages V3 and V4 (Fehr & Caviness, 1977) of plants inoculated or not with *P. pachyrhizi* of repetitions of each treatment were collected to determine the activities of enzymes CHI, GLU, POX, PPO and PAL at 24, 48, 72 and 141 hours after inoculation (hai). The collected leaves were placed in aluminum foil, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

For the extracts used in the determinations of the activities of CHI and GLU, 0.3 g of leaf tissue was powdered in liquid nitrogen in a mortar with the addition of polyvinylpyrrolidone (PVP) (2% w/v). The powder obtained was homogenized in 2 mL 50 mM sodium phosphate (pH 6.5) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenate was centrifuged at 20,000 g for 25 min at 4 °C and the supernatant was used as extract for enzyme determination. The activity of CHI was determined by the method of Robert & Selitrennikoff (1988) modified by Harman *et al.* (1993). The reaction was initiated by addition of 20 μ L aliquots of the supernatant to a mixture of 470 μ L of 50 mM sodium acetate (pH 5.0) and 10 μ L of the substrate p-nitrophenyl- β -DN-N'-diacetylchitobiose (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) at a concentration of 2 mg/mL. The reaction mixture was incubated in a water bath at 37 °C

for 2 h. The reaction was stopped by addition of 500 μL 0.2 M sodium carbonate. In control samples, only the sodium carbonate was added after adding the extract to the reaction mixture and the samples were incubated in a water bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The absorbance of the final product was determined at 410 nm in a spectrophotometer (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The molar extinction coefficient of $7 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used to calculate the activity of CHI, which was expressed as $\mu\text{moles of p-nitrophenyl produced} \times \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$. The GLU activity was determined as described by Lever (1972). The reaction was initiated by addition of 20 μL aliquots of the supernatant to a mixture of 230 μL of 100 mM sodium acetate (pH 5.0) and 250 μL of the substrate laminarin (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) in concentration of 4 mg/mL. The reaction mixture was incubated in a water bath for 30 min at 45 $^{\circ}\text{C}$. After the incubation period, the amount of reducing sugars was determined by adding 250 μL of DNS (dinitrosalicylic acid) to the mixture, followed by incubation in a water bath for 15 min at 100 $^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by cooling the samples in an ice bath to the temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$. In control samples, the reaction mixture was the same except that the plant extract was added after heating the mixture at 100 $^{\circ}\text{C}$. The absorbance was measured at 540 nm and GLU activity was expressed in absorbance units $\times \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$.

To obtain the extracts used for determination of POX and PPO activities, 0.3 g of leaf tissue was powdered in liquid nitrogen in a mortar with addition of PVP (2% w/v). The powder obtained was homogenized in 2 mL 100 mM potassium phosphate (pH 6.8) containing 1 mM PMSF and 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The homogenate was centrifuged at 1,200 g for 15 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and the supernatant was used for enzyme determination. POX activity was determined by the oxidation of pyrogallol according to the method of Kar & Mishra (1976). An aliquot of 100 μL of the extract was added to a mixture of 475 μL distilled water, 375 μL 100 mM potassium phosphate (pH 6.8), 300 μL 100 mM pyrogallol and 300 μL 100 mM hydrogen peroxide. The absorbance was measured at 420 nm in a spectrophotometer (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) every 10 s for 1 min after addition of the extract to the mixture. The molar extinction coefficient of $2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used to calculate the activity of POX (Chance & Maehley, 1955), which was expressed as mol of purpurogalina produced $\times \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$. Throughout the process, the reaction tubes were covered with aluminum foil to protect the mixture from oxidation by light. The PPO activity was determined in a manner similar to that of POX, except that hydrogen peroxide was not used in the mix.

To obtain the extract to determine the activity of PAL, 0.3 g of leaf tissue was powdered in liquid nitrogen in a mortar with the addition of PVP (2% w/v). The powder obtained was homogenized in 2 mL 50 mM sodium borate (pH 8.7) containing 5 mM β -mercaptoethanol and 1 mM EDTA. The mixture was centrifuged three times at 20,000 g for 30 min. The supernatant was used as substrate to determine the activity of PAL. The reaction was initiated by adding 0.25 mL of the extract to a mixture containing 1 mL 0.1 M sodium borate, pH 8.7 and 0.5 mL 20 mM L-phenylalanine. The reaction mixture was incubated in a water bath at 30 °C for 1 h. In control samples, the extract was replaced by 1 mL sodium borate buffer. The reaction was interrupted by addition of 33 μ L 6 M HCl. The absorbance of the derivatives of trans-cinnamic acid was measured in a spectrophotometer (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 290 nm and the molar extinction coefficient of $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zucker, 1965) was used to calculate the activity of PAL, which was expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein.

All enzyme determinations were performed in triplicate. The protein concentration in each sample was determined according to the method of Bradford (1976).

Experimental design and statistical analysis

For the assessment of severity, the experiment was completely randomized with four treatments and five repetitions. The experiment for biochemical analysis was also completely randomized in a 2×4 factorial design with five replicates. The variables were: three inducers and application of CS in the soil and plants inoculated or not with *P. pachyrhizi*. For both experiments, each replicate consisted of a plastic pot containing two soybean plants. The severity data were subjected to analysis of variance and the means of the treatments were compared by the Tukey test at 5% probability level (SAS version 6.12, Institute Inc., 1989, Cary, NC, USA). For the enzyme activity data, the averages of the treatments "inoculated plants" with *P. pachyrhizi* and "non-inoculated plants" were compared by the t-test at 5% probability level, for each collection time point.

Results

ASR severity. The ASR severity was significantly lower on leaves of plants sprayed with ASM and supplied with Si as compared to plants sprayed with JA or distilled water (Fig. 1). There was no significant difference between the treatments ASM and CS and also between JA and control treatments (Fig. 1).

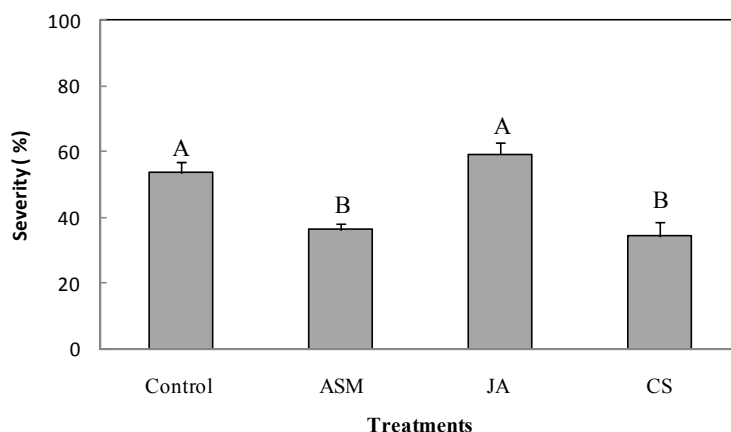


Figure 1. Severity of rust on the leaves of soybean plants that received foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (CS). Bar in each column represents the standard error of the mean. Different letters indicate significant differences among the treatments ($P < 0.05$)

Silicon concentration on soybean leaf tissue. The Si concentration in leaf tissue of plants supplied with Si was significantly higher (2.6 g/kg) compared to plants from the control treatment (0.6 g/kg).

Enzymes activities. For non-inoculated plants in the control treatment, CHI activity increased from 24 to 72 hai and decreased at 141 hai (Fig. 2A). For inoculated plants, CHI activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 2A). The CHI activity for non-inoculated plants in the ASM treatment increased from 48 to 72 hai and decreased thereafter (Fig. 2B). For inoculated plants in the ASM treatment, CHI activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and attained constant values thereafter (Fig. 2B). For non-inoculated plants in the JA treatment, CHI activity increased from 24 to 48 hai and attained constant values thereafter (Fig. 2C). For inoculated plants, CHI activity increased from 24 to 48 hai and decreased at 72 hai to attain constant values thereafter (Fig. 2C). For non-inoculated and inoculated plants amended with CS, CHI activity increased from 24 to 48 hai (Fig. 2D). In the non-inoculated plants, CHI activity decreased at 72 hai and attained constant thereafter (Fig. 2D). For inoculated plants, CHI activity increased at 72 hai and attained thereafter (Fig. 2D). Significant differences between non-inoculated and inoculated plants occurred at 72 hai for the control and ASM treatments, at 24 and 72 hai for the JA treatment, and at 141 hai for the CS treatment (Fig. 2 A, B, and D).

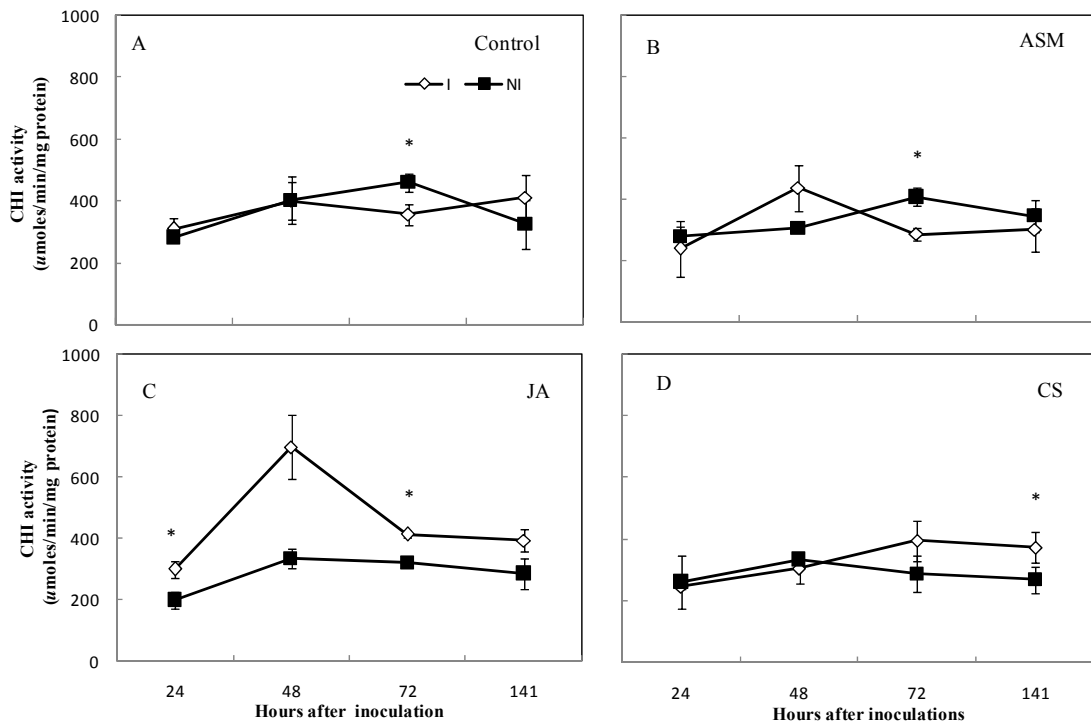


Figure 2. Chitinase (CHI) activity in leaves of soybean plants inoculated or not with *Phakopsora pachyrhizi* and which have previously received a foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (CS). Comparisons between plants inoculated with *P. pachyrhizi* (I) and non-inoculated plants (NI) for each time point, followed by an asterisk (*) are significantly different by the t-test. Bar at each point represents the standard error of the mean.

For non-inoculated plants in the control treatment, GLU activity increased from 24 to 48 hai and decreased thereafter (Fig. 3A). For inoculated plants, GLU activity increased from 24 to 48 hai and attained constant values thereafter (Fig. 3A). The GLU activity for non-inoculated plants in the ASM treatment increased at 48 hai, decreased at 72 hai, and increased at 141 hai (Fig. 3B). For inoculated plants in the ASM treatment, GLU activity increased from 24 to 48 hai and remained with constant values thereafter (Fig. 3B). For non-inoculated plants sprayed with JA, GLU activity was kept constant for all sampling times (Fig. 3C). For inoculated plants, GLU activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased at 141 hai (Fig. 3C). The GLU activity for non-inoculated plants amended with CS decreased from 24 to 48 hai and increased until 141 hai (Fig. 3D). For inoculated plants, GLU activity increased from 24 to 48 hai, and decreased until 141 hai (Fig. 3D). For the control treatment, significant differences

between non-inoculated and inoculated plants occurred at 24, 48, and 141 hai and for the ASM treatment, significant difference occurred only at 72 hai (Fig. 3A and B).

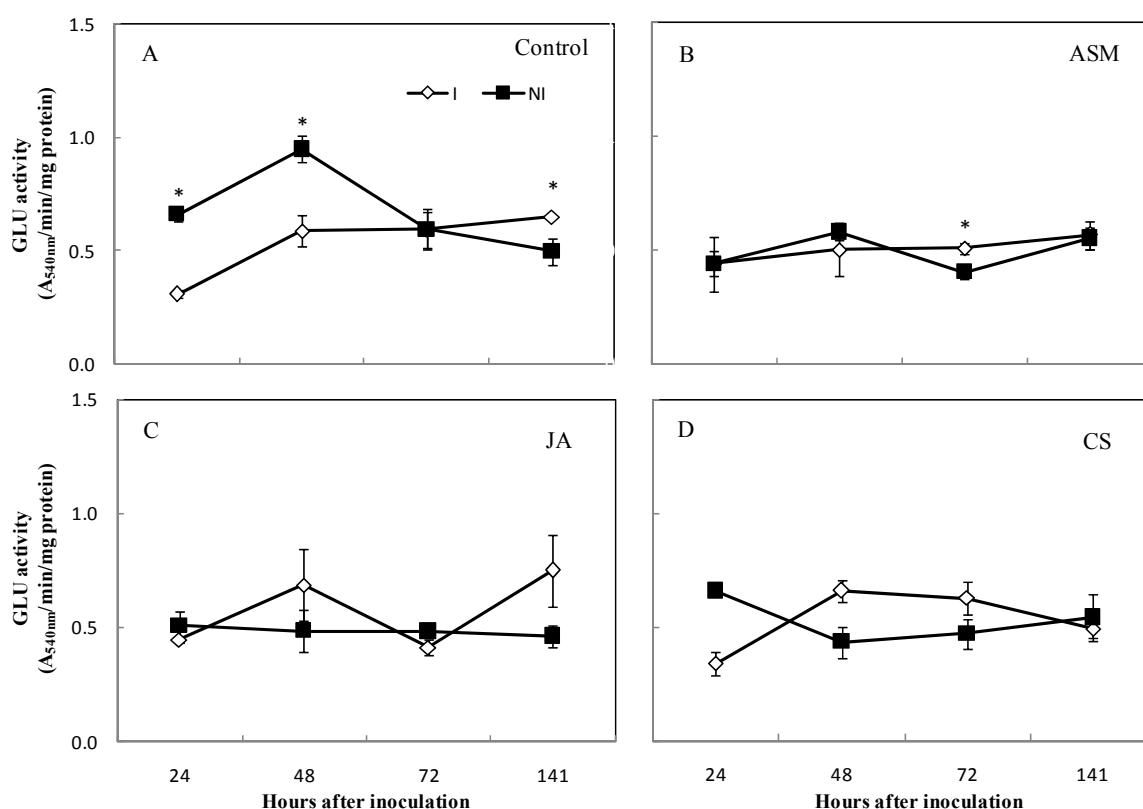


Figure 3. β -1,3-glucanase (GLU) activity in leaves of soybean plants inoculated or not with *Phakopsora pachyrhizi* and which have previously received a foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (SC). Comparisons between plants inoculated with *P. pachyrhizi* (I) and non-inoculated plants (NI) for each time point, followed by an asterisk (*) are significantly different by the t-test. Bar at each point represents the standard error of the mean.

POX activity in non-inoculated and inoculated plants for the control treatment showed the same tendency; but POX activity was lower for non-inoculated plants at 24 and 141 hai (Fig. 4A). For non-inoculated and inoculated plants sprayed with ASM, POX activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter with the highest values occurring for non-inoculated plants (Fig. 4B). Non-inoculated and inoculated plants sprayed with JA showed an increase on POX activity from 24 to 48 hai (Fig. 4C). In the non-inoculated plants, POX activity decreased at both 72 and 141 hai (Fig. 4C). For inoculated plants, POX activity increased at 72 hai and was kept

high thereafter (Fig. 4C). For non-inoculated plants amended with CS, POX activity increased until 72 hai and remained constant thereafter (Fig. 4D). For inoculated plants, POX activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 4D). Significant differences between non-inoculated and inoculated plants occurred only at 141 hai for control and CS treatments (Fig. 4 A and D).

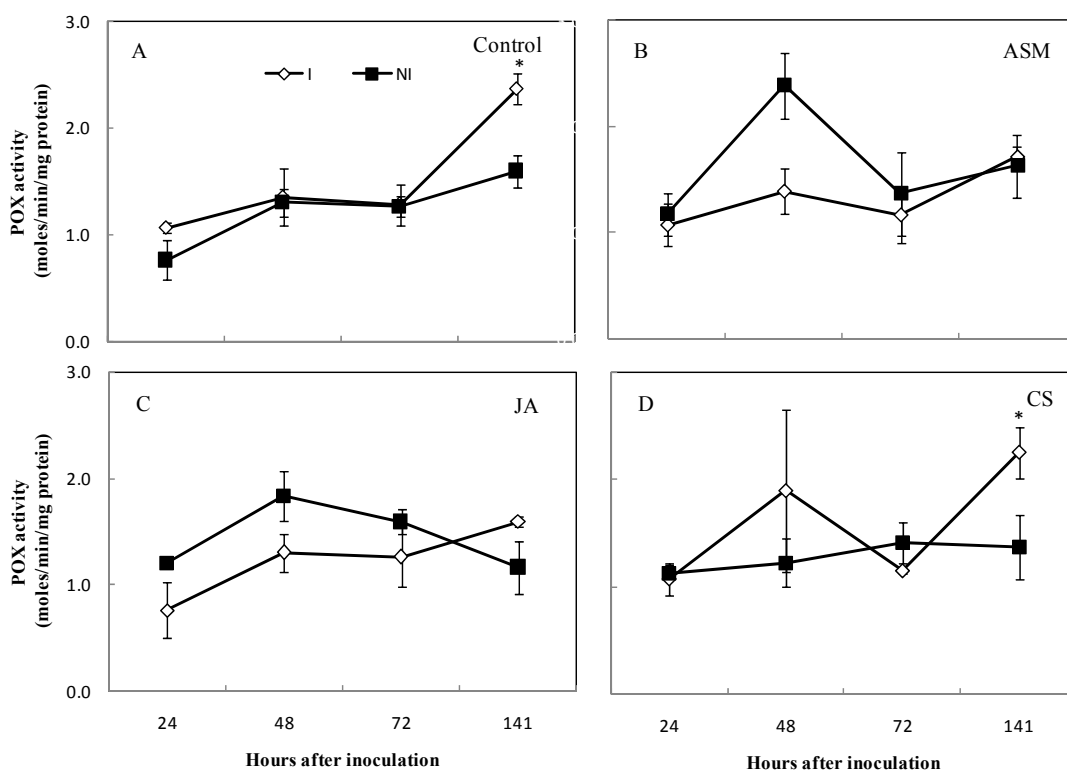


Figure 4. Peroxidase (POX) activity in leaves of soybean plants inoculated or not with *Phakopsora pachyrhizi* and which have previously received a foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (CS). Comparisons between plants inoculated with *P. pachyrhizi* (I) and non-inoculated plants (NI) for each time point, followed by an asterisk (*) are significantly different by the t-test. Bar at each point represents the standard error of the mean.

PPO activity in non-inoculated plants for the control treatment increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 5A). For inoculated plants in the control treatment, PPO activity increased from 24 to 141 hai (Fig. 5A). For non-inoculated plants sprayed with ASM, PPO activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 5B). For inoculated plants sprayed with ASM, PPO activity increased from 24 to 48 hai, remained constant until 72 hai,

and increased at 141 hai (Fig. 5B). For non-inoculated plants sprayed with JA, PPO activity increased until 72 hai and decreased at 141 hai (Fig. 5C). For inoculated plants, PPO activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 5C). For non-inoculated plants amended with CS, PPO activity increased until 72 hai and decreased at 141 hai (Fig. 5D). For inoculated plants, PPO activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72, and increased at 141 hai (Fig. 5D). There was no significant difference between non-inoculated and inoculated plants for any treatment (Fig. 5 A-D).

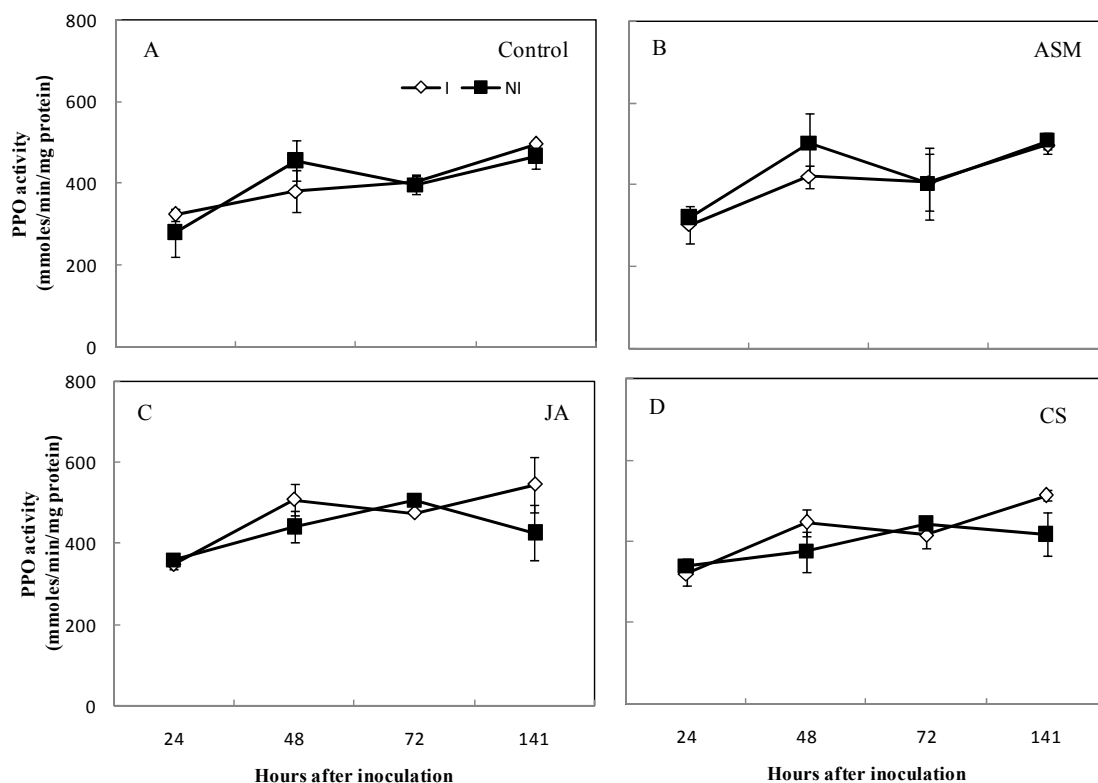


Figure 5. Polyphenol oxidase (PPO) activity in leaves of soybean plants inoculated or not with *Phakopsora pachyrhizi* and which have previously received a foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (CS). Comparisons between plants inoculated with *P. pachyrhizi* (I) and non-inoculated plants (NI) for each time point, followed by an asterisk (*) are significantly different by the t-test. Bar at each point represents the standard error of the mean.

For non-inoculated plants in the control treatment, PAL activity increased constantly from 24 to 72 hai, and remained constant until 141 hai (Fig. 6A). The PAL activity increased for inoculated plants in the control treatment from 24 to 48 hai, and decreased thereafter (Fig. 6A). For non-inoculated plants sprayed with ASM, PAL

activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72, and increased thereafter (Fig. 6B). For inoculated plants sprayed with ASM, PAL activity increased constantly from 24 to 141 hai (Fig. 6B). For non-inoculated plants sprayed with JA, PAL activity increased until 48 hai, decreased at 72 hai, and remained constant thereafter (Fig. 6C). For inoculated plants, PAL activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and increased thereafter (Fig. 6C). For non-inoculated plants amended with CS, PAL activity increased until 72 hai and decreased at 141 hai (Fig. 6D). For inoculated plants, PAL activity increased from 24 to 48 hai, decreased at 72 hai, and remained constant at 141 hai (Fig. 6D). Significant differences between non-inoculated and inoculated plants occurred only for the ASM treatment at 72 and 141 hai (Fig. 6B).

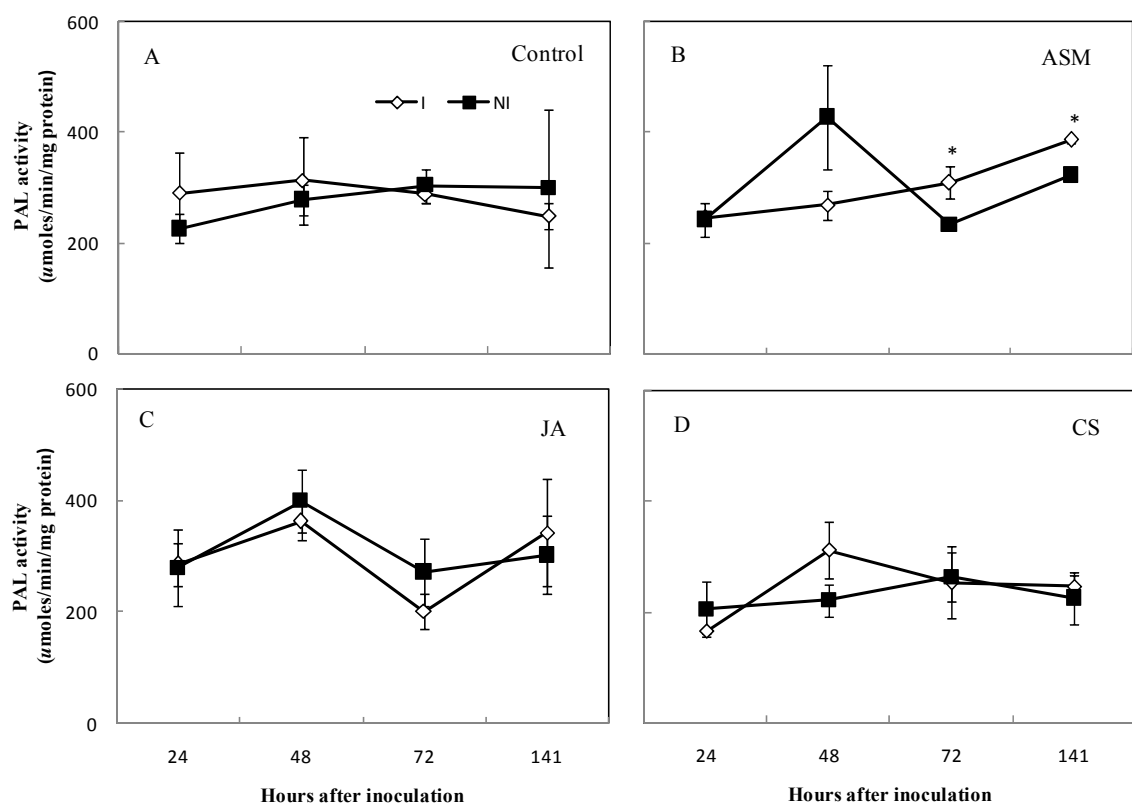


Figure 6. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in leaves of soybean plants inoculated or not with *Phakopsora pachyrhizi* and which have previously received a foliar application of distilled water (Control), acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) or were grown in soil containing calcium silicate (CS). Comparisons between plants inoculated with *P. pachyrhizi* (I) and non-inoculated plants (NI) for each time point, followed by an asterisk (*) are significantly different by the t-test. Bar at each point represents the mean standard error.

Discussion

Although the soybean-*P.pachyrhizi* pathosystem has been extensively studied, information on the biochemical events resulting from this interaction when using ASM, JA and CS is still incomplete. In this study, differential responses were observed for both the severity of ASR and the activity of defense enzymes depending on the inducer used and even the supply of Si. Soybean resistance to ASR was enhanced by the use of ASM and CS. There was an increase of CHI enzyme activity in plants inoculated with *P. pachyrhizi* and supplied with CS and of PAL and GLU enzymes in plants inoculated and subjected to application of ASM.

The reduced ASR severity with the application of ASM and increased susceptibility of plants that received the application of JA indicate the existence of an antagonism between the defense routes mediated by these two inducers in soybean-*P. pachyrhizi* pathosystem. According to Makandar *et al.* (2010), application of ASM in leaves of wheat plants was able to activate both the SA and the JA routes. However, wheat plants and *Arabidopsis* mutants for the route JA were resistant to *Fusarium graminearum* showing that the JA route increased the susceptibility of plants to infection by fungal pathogens by slowing down the signal transduction mediated by SA (Makandar *et al.*, 2010).

Even considering that Si accumulates at intermediate levels in soybean (Jones & Handreck, 1967), the application of CS in the soil was effective in reducing the severity of ASR in this study. In rice, sorghum and wheat, the supply of Si through the root system reduced the severity of economically important diseases such as blast, anthracnose and powdery mildew (Rodrigues *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2009; Rhémus-Boreal *et al.*, 2005). The reduction of ASR severity was also verified by Lemes *et al.* (2011), both with the application of Si in the soil and with foliar application of potassium silicate. These compounds enabled the reduction in the area under the disease progress curve of 43 and 36%, respectively, and increased the incubation period in relation to control plants grown in soil deficient in Si. Reductions from 65 and 70% in the severity of coffee rust and ASR, respectively, also occurred with the application of potassium silicate (Pereira *et al.*, 2009a, Rodrigues *et al.*, 2009). However, Pereira *et al.* (2009b) found no increase on the activity of defense enzymes in coffee plants sprayed with potassium silicate and ASM.

Unlike the hypothesis that Si would act only as a structural barrier through deposition and polymerization below the cuticle forming a cuticle-silica double layer which would prevent or delay pathogen penetration (Yoshida, 1962), molecular and

biochemical studies have shown activation of resistance genes and the production of antimicrobial compounds in plants of rice and wheat supplied with Si (Fawe *et al.*, 1998; Brunings *et al.*, 2009). Rodrigues *et al.* (2004) demonstrated the existence of high levels of phytoalexins momilactone A and B in rice leaves inoculated with *Pyricularia grisea* and supplied with Si unlike what was obtained in leaves of plants not supplied with Si and inoculated with *P. grisea*. Rice plants and cucumber supplied with Si and inoculated with *Bipolaris oryzae* and *Podosphaera xantii*, respectively, showed an increase in the activity of peroxidase and chitinase (Dallagnol *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2005).

In the present study, for the plants supplied with Si (CS), the increased activity of CHI occurred early in the onset of the ASR symptoms and the activity of GLU was enhanced only in plants treated with ASM. Parallel changes in the activities of CHI and GLU were reported by Collinge *et al.* (1993) and justified by the joint action of these enzymes in defense against pathogens. The CHI catalyzes the hydrolysis of chitin (a polymer of N-acetylglucosamine) and GLU catalyzes the degradation of glucan, a cell wall component of fungi, releasing oligosaccharides that have the ability to activate defense responses in plants (Misaghi, 1982). Thus, it is clear that these hydrolytic enzymes are important in some way, to restrict the colonization of leaf tissue of soybean by *P. pachyrhizi*.

The POX enzyme is related to the oxidative protection process by catalyzing the oxidation of cellular components such as hydrogen peroxide and to the increase in the synthesis of lignin that strengthens the cell wall against the action of lytic enzymes produced by pathogens (Misaghi, 1982). In the present study, there was a trend of increased activity of POX in the early onset of ASR symptoms. However, the contribution of this enzyme for soybean resistance to ASR was inconclusive. In contrast, Rodrigues *et al.* (2005) observed an increased amount of transcripts for POX in rice plants of a cultivar susceptible to blast supplied with Si.

The participation of polyphenol oxidases in plant resistance to attack by pathogens is due to its activity which leads to the oxidation of phenolic compounds into quinones, which are toxic to pathogens (Misaghi, 1982). However, in this study, no relationship could be established between PPO activity and ASR resistance.

According to Pereira *et al.* (2009a), ASM was effective in reducing the severity of ASR, but was unable to enhance the activity of the enzymes CHI, GLU, POX, PPO, PAL and lipoxygenase. However, in the present study it was found that ASM was effective in increasing the activity of PAL between 72 and 141 hai, and potentiating the

activity of GLU at 72 hai. Interestingly, among all the enzymes studied, only PAL showed a trend of increased activity with the use of ASM, which may be attributed, among other factors, to the importance of this enzyme in the phenylpropanoid route. This route is initiated by conversion of L-phenylalanine to trans-cinnamic acid in a deamination reaction catalyzed by PAL, which is important for the production of antimicrobial phenolic compounds, and phytoalexins, and the final product of this route is lignin (Naoumkina *et al.*, 2010).

Increased activity of PAL as a result of ASM treatment was also reported by Rodrigues *et al.* (2006) in cowpea-*Fusarium oxysporum* f.sp. tracheiphilum pathosystem; by Saravanan *et al.* (2004) on banana-*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense and by Campos *et al.* (2004) in the *Colletotrichum lindemuthianum*-bean interaction. According to Liang *et al.* (2005), activation of PAL was dependent on the level of resistance of cucumber cultivars to *Podosphaera xanthii*.

The results of this study reinforce the reports in the literature that the severity of ASR is reduced by application of ASM and the supply of Si in the soil, and also indicate that an increased activity of defense enzymes CHI, PAL and GLU contribute to enhance soybean resistance to ARS.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for granting a PhD scholarship of the first author, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG for financial support, and CNPq for providing research fellowships to F. A. Rodrigues, M. A. Moreira and E. G. Barros. The authors are grateful to Syngenta Crop Protection Ltd. and the company Harsco Minerais Ltda for providing the Bion® and AgroSilício®, respectively.

References

- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Höfte M, 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* **53**, 65-72.
- Bradford MN, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M, 2009. Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol* **155**, 161-170.
- Campos AD, Ferreira AG, Hampe MMV, Antunes IF, Brançãõ N, Silveira EP, Silva JB, Osorio VA, 2004. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **15**, 129-134.
- Chance B, Maehley AC, 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **2**, 764-775.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K, 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* **3**, 31-40.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FÁ, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE, 2009. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* **99**, 116-121.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FÁ, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC, 2011. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* **101**, 92-104.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold K, 2007. Silicon and Plant Disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM, eds. *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, 233-246.
- Dong X, 1998. AS, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 316-323.
- Fawe A, About-Zaid , MMenzies JG, Belánger RR, 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* **88**, 396-401.
- Fehr WR, Caviness CE, 1977. Stages of soybean development. Ames, Iowa State University Press. (Special Report 80).
- Godoy CV, Koga LJ, Canteri MG, 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 63-68.
- Halim VA, Eschen-Lippold L, Altmann S, Birschwilks M, Scheel D, Rosahl S, 2007. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **20**, 1346-1352.
- Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Pietro A, Peterbauer C, Tronsmo A, 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* **83**, 313-318.

- Hoagland R, Arnon I, 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Circular of the California Agricultural Experiment Station* **347**, 1-32.
- Jones LHP, Handreck KA, 1967. Silica in soils, plants, and animals. *Advances Agronomy* **19**, 107-49
- Kar M, Mishra D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**, 315-319.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A, 2004. Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia. (Boletim Técnico 2).
- Lemes EM, Mackowiak CL, Blount A, Marois JJ, Wright, DL, Coelho L, Datnoff LE, 2011. Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. *Plant Disease* **95**, 317-324.
- Lever M, 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* **47**, 273-279.
- Liang, YC, Sun, WC, Si J, Römheld V, 2005. Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology* **54**, 678-685.
- Liu C, Ruan Y, Lin Z, Wei R, Peng Q, Guan C, Ishii H, 2008. Antagonism between acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**, 141-145.
- Li X, Esker PD, Pan Z, dias AP, Xue L, Yang XB, 2010. The uniqueness of the soybean rust pathosystem. *Plant Disease* **94**, 796-806.
- Luo Y, Shang J, Zhao P, Xi D, Yuan S, Lin H, 2011. Application of jasmonic acid followed by salicylic acid inhibits cucumber mosaic virus replication. *The Plant Pathology Journal* **27**, 53-58.
- Makandar R, Nalam V, Chaturvedi R, Jeannotte R, Sparks AA, Shah J, 2010. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **23**, 861-870.
- Misaghi IJ, 1982. *Physiology and Biochemistry of Plant-Pathogen Interactions*. New York, N.Y: Plenum Press.
- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA, 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology* **11**, 829-846.

- Ogle HJ, Byth DE, McLean R, 1979. Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in South-eastern Queensland. *Australasian Journal of Agricultural Research* **30**, 883-893.
- Pereira, SC, Rodrigues, FA, Carré-Missio V, Oliveira MGA, Zambolim L, 2009a. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology* **34**, 164-170.
- Pereira, SC, Rodrigues, FA, Carré-Missio V, Oliveira MGA, Zambolim L, 2009b. Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. *Tropical Plant Pathology* **34**, 223-230.
- Reis EM, Bresolin ACR, Carmona M, 2006. Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Passo Fundo, BR: Universidade de Passo Fundo.
- Resende RS, Rodrigues FA, Soares JM, Casela CR, 2009. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal Plant Pathology* **124**, 533-541.
- Rhémus-Boreal W, Menzies JG, Bélanger RR, 2005. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**, 108-115.
- Ribeiro AS, Moreira JUV, Pierozzi PHB, Rachid BF, Toledo JFF, Arias CAA, Soares RM, Godoy CV, 2007. Genetic control of asian rust in soybean. *Euphytica* **157**, 15-25.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP, 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* **134**, 169-176.
- Rodrigues AAC, Bezerra Neto E, Coelho RSB, 2006. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 492-499.
- Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndörfer GH, Zambolim L, 2009. Foliar application of potassium silicate on the control of soybean rust. *Australasian Plant Pathology* **38**, 366-372.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA, 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**, 144-159.
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N, 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* **94**, 177-183.

- Saravanan T, Bhaskaran R, Muthusamy M, 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt. *Plant Pathology Journal* **3**, 72-80.
- Schweizer P, Buchala A, Dudler R, Métraux JP, 1998. Induced systemic resistance in wounded rice plants. *The Plant Journal* **14**, 475-481.
- Sinclair JB, Hartman GL, 1999. Soybean Rust. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC, eds. *Compendium of Soybean Diseases*. St. Paul: MN, The American Phytopathological Society, 25-26.
- Yamanaka N, Yamaoka Y, Kato M, Lemos NG, Passianotto ALL, Santos JVM, Benitez ER, Abdelnoor RV, Soares RM, Suenaga K, 2010. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. *Tropical Plant Pathology* **35**, 153-162.
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV, Nunes Júnior J, 2003. Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease* **89**, 675-677.
- Yoshida S, Ohinishi Y, Kitagishi K, 1962. Chemical forms, mobility, and deposition of silicon in the rice plant. *Japanese Journal Soil Science Plant Nutrition* **8**, 107-111.
- Zucker M, 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* **40**, 779-784.