



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IGOR MATHEUS OLIVEIRA DOS SANTOS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E EFEITO ANTIMICROBIANO
DE METABÓLITOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PARA O
PATOSSISTEMA SOJA-*Phakopsora pachyrhizi***

Londrina
2019

IGOR MATHEUS OLIVEIRA DOS SANTOS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E EFEITO ANTIMICROBIANO
DE METABÓLITOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PARA O
PATOSSISTEMA SOJA-*Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Igor Matheus Oliveira dos Santos.

Indução de resistência e efeito antimicrobiano de metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* para o patossistema soja-*Phakopsora pachyrhizi*. / Igor Matheus Oliveira dos Santos Santos. - Londrina, 2019. 54 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.

Coorientador: Francismar Correa Marcelino-Guimaraes.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2019. Inclui bibliografia.

1. Compostos bioativos - Tese. 2. Elicitores - Tese. 3. Metabólitos secundários - Tese. 4. SAR - Tese. I. Andrade, Galdino. II. Marcelino-Guimaraes, Francismar Correa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

IGOR MATHEUS OLIVEIRA DOS SANTOS

**METABÓLITOS DE *Pseudomonas aeruginosa* COMO INDUTORES
DE GENES DE RESISTÊNCIA EM SOJA E SEU USO NA INTERAÇÃO
SOJA-*Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Michele Regina Lopes da Silva
Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

Londrina, 26 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio ao longo de minha vida e por serem sempre uma infinita fonte de bondade, ternura e inspiração;

Ao Dr. Galdino Andrade pela orientação que possibilitou a realização desse trabalho, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos e experiências adquiridos durante minha participação no Laboratório de Ecologia Microbiana;

À Embrapa Soja e a Dra. Francismar Correa Marcelino Guimaraes por permitirem a realização deste trabalho, em especial a Dra. Francismar pela orientação e conselhos fornecidos durante todo o trabalho;

À Valeria Yukari Abe por toda a paciência, pelos ensinamentos e pela ajuda concedida durante o desenvolvimento dos experimentos, e aos amigos da Embrapa Soja;

À Stheace, pela constante inspiração durante todo o decorrer do mestrado e por toda a ajuda e carinho fornecidos ao longo dessa trajetória;

Aos meus amigos de laboratório André, Ane, Miguel, Flávio, Erika, Mateus, Janaina e todos os demais, por toda ajuda, apoio e companheirismo, tanto nas dificuldades quanto nos momentos de descontração;

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

A recompensa de uma boa obra é tê-la feito;
a recompensa do esforço é ter crescido.
- A. D. Sertillanges

Santos, Igor Matheus Oliveira dos. **Metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* como indutores de genes de resistência em soja e seu uso na interação soja-*Phakopsora pachyrhizi***. 2019. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, é a doença mais severa que acomete a cultura e está presente em todas as regiões produtoras do mundo. O controle da doença é realizado principalmente pela utilização de fungicidas, os quais, além de aumentarem os custos de produção, têm sua eficiência reduzida à medida que novas cepas resistentes do patógeno vão surgindo. Novas alternativas de controle bem como novas moléculas antifúngicas devem, portanto, ser testadas de forma a diminuir os danos causados pela FAS. O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade dos compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em induzir a resistência em plantas de soja, bem como investigar sua eficácia no controle da FAS. Os testes foram conduzidos utilizando uma fração semi-purificada denominada F4A extraída dentre os metabólitos da cepa LV. Três principais moléculas foram purificadas da F4A, o ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), a fenazina carboxamida (PCN) e uma molécula organometálica (OAC). Testes *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para verificar a atividade da F4A e de cada molécula na ativação da resistência da planta e no controle da FAS. No teste de germinação detectou-se que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A inibiu completamente a germinação dos esporos. No experimento *in vivo* a aplicação de 2 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A reduziu a severidade em 31.8 e 41.5% respectivamente, enquanto a frequência de lesões foi reduzida em 32%. A concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCA reduziu a severidade em 50.2%, enquanto $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do OAC reduziu em 33.8%. Apenas o OAC foi capaz de induzir a expressão dos genes de defesa PAL, OMT e PR-2. O estudo mostrou que os metabólitos produzidos pela cepa LV possuem o potencial de controlar a FAS, contudo futuros estudos devem ser realizados para se obter uma formulação entre as moléculas que resulte no completo controle do patógeno.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Elicitores. Metabólitos secundários. SAR.

Santos, Igor Matheus Oliveira dos. **Use of *Pseudomonas aeruginosa* metabolites as resistance genes inducers in soybean and its use on soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction.** 2019. 54 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The Asian Soybean Rust (ASR), caused by the biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is the most severe disease infecting soybean, is present in all soybean producing areas around the world. ASR control is carried out mainly using fungicides, which increase production costs, and have their efficiency reduced by the emergence of new resistant races of the pathogen. A new control alternative is to find new molecules to control ASR damage. The present study aimed to evaluate the ability of extracellular compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain to induce resistance in soybean plants, as well as investigate its efficacy to control ASR. The experiments were conducted using a semi-purified fraction called F4A, extracted from the metabolites of the LV strain. Three main molecules were purified from the F4A, phenazine-1-carboxylic acid (PCA), Phenazine caboxamide (PCN) (OAC). Tests *in vitro* and *in vivo* were conducted to verify the activity of F4A and each molecule in the activation of plant resistance and control of ASR. In the germination test 100 µg mL⁻¹ of F4A completely inhibited spore germination. In *in vivo* experiment the application of 2 and 20 µg mL⁻¹ of F4A reduced disease severity in 31.8 and 41.5% respectively, both concentrations reduced the frequency of injuries by 32%. The 60 µg mL⁻¹ concentration of PCA reduced the severity by 50.2%, while 5 µg mL⁻¹ of OAC decreased by 33.8%. Only the OAC was able to induce defense gene expression of PAL, OMT and PR-2. The study showed that metabolites produced by the LV strain have a potential to control ASR, however future studies should be carried out to obtain a formulation among the molecules that results in complete pathogen control.

Key words: Bioactive compounds. Elicitors. Secondary metabolites. SAR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* em ágar-água acrescido de diferentes doses do metabólito F4A produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV..35
- Figura 3.2** - Porcentagem de germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* em ágar-água acrescido de diferentes doses do metabólito F4A produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV.....36
- Figura 3.3** - Expressão de genes de defesa em plantas de soja após tratamentos com diferentes metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.....37
- Figura 3.4** - Severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja tratadas com metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas...38
- Figura 3.5** - Folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* e pulverizadas com diferentes metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.....39
- Figura 3.6** - Frequência de lesões de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja tratadas com metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.....40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 2.1 – Famílias descritas de proteínas relacionadas à patogênese em plantas	22
Tabela 3.1 – Descrição dos tratamentos utilizados no experimento de indução de resistência	32
Tabela 3.2 – Oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-qPCR.....	32
Tabela 3.3 – Descrição dos tratamentos utilizados no experimento de severidade contendo os produtos utilizados e as respectivas doses.....	33

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
AJ	Ácido Jasmônico
AJ-IIe	Ácido Jasmônico Isoleocina
AN	Ágar Nutriente
AOC	Aleno Óxido Ciclase
AOS	Aleno Óxido Sintase
AS	Ácido Salicílico
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTI	DAMP Trigger Immunity
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Etileno
ETI	Effector Trigger Immunity
F4A	Fração 4A
FAS	Ferrugem Asiática da Soja
FL	Frequência de Lesões
G3P	Glicerol-3-Fosfato
GE	Auxina
ICS	Isocorismato Sintase
JAR	Jasmonic Acid Resistance
JAZ	Jasmonate Zim-Domain
LOX	Lipoxigenase
MAMP	Microrganism Associated Molecular Pattern
MTI	MAMP Trigger Immunity
NBS-LRR	Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat
NO	Óxido Nítrico
OAC	Organometálico
OMT	O-metiltransferase
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase
PCA	Ácido Fenazina-1-Carboxílico
PCN	Fenazina-1-Carboxiamida

PRP	Proteínas Relacionadas a Patogênese
PRR	Pattern Recognition Receptors
PST	Proteínas Semelhantes A Taumatina
RI	Resistência Induzida
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RSI	Resistência Sistêmica Induzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A CULTURA DA SOJA	15
2.2	FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA	15
2.3	IMUNIDADE VEGETAL	16
2.3.1	Imunidade Desencadeada Por MAMP/DAMP	17
2.3.2	Imunidade Desencadeada Por Efetor	17
2.3.3	Respostas De Defesa Localizadas	18
2.4	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	19
2.4.1	Resistência Sistêmica Adquirida (RSA)	19
2.4.2	Hormônios Relacionados A Resistência	20
2.4.3	Proteínas Relacionadas A Patogênese (PRP)	21
2.4.4	INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DE <i>P. PACHYRHIZI</i>	24
2.5	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> NO CONTROLE DE DOENÇAS.....	25
3	ARTIGO: METABÓLITOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> COMO INDUTORES DE GENES DE RESISTÊNCIA EM SOJA	27
3.1	RESUMO	27
3.2	ABSTRACT	28
3.3	INTRODUÇÃO	29
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.4.1	Produção de Metabólitos	30
3.4.2	Susceptibilidade dos esporos de <i>P. pachyrhizi</i> ao metabólito F4A	31
3.4.3	Expressão gênica de plantas de soja tratadas com metabólitos de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> cepa LV.	32
3.4.4	Experimento interação soja- <i>P. pachyrhizi</i>	33
3.4.5	Análise Estatística.....	34
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.6	CONCLUSÃO	44
4	CONCLUSÕES GERAIS	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é a doença mais severa que incide sob a cultura da soja, podendo levar a perdas de até 90% da produção. Estima-se que, somente em perdas de produção a FAS gerou um custo de US\$ 10,1 bilhões nos 8 primeiros anos após sua chegada ao Brasil, sendo responsável por um custo anual estimado em US\$ 2,2 bilhões (GODOY et al. 2009; GODOY et al. 2016). A principal estratégia adotada para o controle do fungo é a utilização de fungicidas químicos. Contudo, o uso incorreto desses defensivos resulta no desenvolvimento de cepas resistentes, o que diminui ainda mais as alternativas de controle da doença (GODOY et al., 2016).

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa contra organismos patogênicos. Tais mecanismos permanecem latentes até a sua ativação por um patógeno ou por um agente externo denominado elicitor (OLIVEIRA, VARANDA, FÉLIX, 2016). Esses mecanismos são divididos em Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e vários compostos podem ser utilizados para induzir esse tipo de resposta de forma a controlar efetivamente o ataque de patógenos (SREEJA, 2014; WALTERS, RATSEP, HAVIS, 2013). Nesse sentido, a utilização de compostos capazes de induzir a resistência de plantas ao ataque de patógenos se torna uma alternativa no controle da FAS (OLIVEIRA et al., 2015).

Uma grande variedade de compostos indutores podem ser obtidos por meio de microrganismos (BUENSANTEAI et al., 2008; RAMESH SUNDAR et al., 2008), como o ergosterol (VATSA et al., 2011), a proteína harpin (DAYAN, CANTRELL, DUKE, 2009), o 2,4-diacetilfloroglucinol (WELLER et al., 2012) e lipopolisacarídeos bacterianos (SILIPO et al., 2010). Entre os microrganismos conhecidos por produzirem moléculas indutoras grande destaque é dado às bactérias do gênero *Pseudomonas* (HERMAN, DAVIDSON, SMART, 2008; VAN WEES, VAN DER ENT, PIETERSE, 2008).

Oliveira et al. (2016), Murate et al. (2015) e Simionato et al. (2017) trabalharam com extratos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e identificaram compostos com ação antimicrobiana em relação a *Xanthomonas axonopodis* e *Botrytis cinerea*. Munhoz et al. (2017) demonstraram que a aplicação desses compostos foi capaz de induzir a resistência em plantas de tomate ao ataque de *Pectobacterium carotovorum*, enquanto Pistori et al. (2018)

também detectaram que a aplicação dos metabólitos induziu a resistência em citrus reduzindo a infecção de Candidatus *Liberibacter*, demonstrando o potencial dos metabólitos da cepa LV para a proteção de plantas.

Diante do apresentado, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos metabólitos da cepa LV no patossistema Soja-*P. pachyrhizi*. Para tanto foram testadas as seguintes hipóteses: (1) Os metabólitos da *P. aeruginosa* cepa LV induzem a expressão de genes relacionados a resistência PR-1, PR-2, PR-5, PAL e OMT em soja, e (2) a aplicação dos metabólitos controla infecções causadas por *P. pachyrhizi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA SOJA

Introduzida no Brasil em 1882, a soja (*Glycine max* L.) se destacou como a cultura que apresentou a maior expansão entre os anos de 1960 e 2010, sendo atualmente a espécie mais cultivada em todo o país (GODOY et al., 2016). O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, atrás somente dos Estados Unidos. Na safra 2017/18, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), um total de 34,88 milhões de hectares destinaram-se a produção de soja no país, resultando em uma produção de 117,8 milhões de toneladas.

No entanto, apesar da alta produção em relação ao cenário mundial, o cultivo da soja no Brasil apresenta como principal fator limitante a grande incidência de doenças, em especial a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) (BARBOSA, CENTURION, FERRAUDO, 2011).

2.2 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

A FAS é a doença mais severa que acomete a cultura da soja (LANGENBACH et al., 2016). É causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, relatado pela primeira vez no Brasil em 2001 (CUNHA, JULIATTI, REIS, 2014). Atualmente o patógeno pode ser encontrado em todas as áreas produtoras de soja no mundo causando perdas de até 90% quando as condições são favoráveis ao patógeno (BARBOSA, CENTURION, FERRAUDO, 2011; LANGENBACH et al., 2016).

Desde o seu primeiro relato no Brasil em 2001 até 2014, a FAS causou uma perda estimada de mais de US\$ 10 bilhões (GODOY et al., 2009). As medidas de controle utilizadas contra a FAS são a adoção de cultivares resistentes, plantio de variedades precoces, eliminação de hospedeiros alternativos, utilização de vazio sanitário e principalmente a utilização de fungicidas químicos, que constitui a estratégia mais eficiente (GODOY et al., 2009). Para o adequado controle da *P. pachyrhizi*, são necessárias pelo menos 3 aplicações de fungicidas durante o ciclo da cultura, o que implica em um custo de US\$ 2,2 bilhões por ano. No entanto, o uso excessivo desses defensivos pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes do fungo, o que compromete a obtenção de altos rendimentos (GODOY et al., 2016). Assim, o uso de fungicidas junto a medidas de controle alternativas se faz

necessário para o controle adequado e seguro da FAS (BARROS, 2011).

Dentre as medidas alternativas para o controle de doenças, a indução de resistência, definida como a ativação dos mecanismos de defesa ou da imunidade da planta, apresenta grande potencial no controle de doenças, incluindo a FAS (MENEGETTI et al., 2010).

2.3 IMUNIDADE VEGETAL

As plantas, como organismos sésseis, estão em contínua interação com o ambiente em seu entorno, percebendo-o e alterando seu metabolismo de acordo com a estratégia necessária, como por exemplo o fechamento de estômatos em períodos de escassez de água (ZHANG et al., 2008) e a neutralização de alumínio tóxico por meio de exsudatos radiculares (MORITA et al., 2008). As plantas interagem também com os demais organismos em uma ampla variedade de relações mutualísticas, parasíticas ou comensais. Avaliando essas relações na interação planta-microrganismo, em especial as relações parasíticas, é possível observar que o número de organismos potencialmente fitopatogênicos em um determinado ambiente é enorme, e mesmo assim, apenas um pequeno número desses organismos consegue efetivamente penetrar a planta e completar o seu ciclo de vida. Esse fenômeno é resultante da imunidade vegetal, a qual permite a planta identificar microrganismos possivelmente patogênicos e então ativar seus mecanismos de defesa para impedir seu crescimento e o estabelecimento da doença (TAIZ et al., 2017).

Os mecanismos de defesa vegetal podem ser constitutivos, ou pré-formados, presentes na planta independentemente de fatores externos, como por exemplo a presença de cutícula, tricomas, alcalóides e fenóis, ou podem ser ativados por meio da identificação de um organismo patogênico, desencadeando uma resposta mais apropriada ao ataque (STANGARLIN et al., 2011). A esse último caso denomina-se defesa induzida e é decorrente da imunidade inata da planta (*Plant Innate Immunity*) (RAMIREZ-PRADO et al., 2018). A imunidade inata consiste em duas barreiras de defesa reguladas por sinais moleculares altamente eficientes. A primeira barreira consiste no reconhecimento de organismos potencialmente patogênicos por meio de proteínas receptoras de reconhecimento de padrões (PRRs- *Pattern Recognition Receptors*) localizadas na membrana plasmática (LI et al., 2016). A segunda barreira consiste no reconhecimento de moléculas específicas utilizadas pelos patógenos

para burlar as PRRs (CHOI, WOO, KLESSIG, 2016).

2.3.1 Imunidade Desencadeada por MAMP/DAMP

As proteínas PRRs são receptores responsáveis por reconhecerem padrões moleculares presentes em classes específicas de microrganismos, como a quitina de fungos e os flagelos de bactérias, os quais denominam-se padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP – Microorganism Associated Molecular Pattern). Paralelo aos MAMPs, alguns sinais moleculares ligados à degradação de algum constituinte da célula vegetal também são reconhecidos pelas proteínas PRRs, uma vez que representam a atividade invasiva de algum microrganismo patogênico e, por isso, são denominados padrão molecular associado ao dano (DAMP – Damage Associated Molecular Pattern) (CHOI, HYONG WOO, KLESSIG, 2016).

Assim que os PRRs reconhecem um desses padrões uma cascata de reações é iniciada, a qual resultará em uma resposta de defesa localizada. Na maioria das vezes essa reação culmina na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas também pode resultar em mudanças físicas como o engrossamento da parede celular, deposição de calose e formação de tilose, ou em respostas bioquímicas como a produção de metabólitos secundários e de hormônios de defesa como o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ). Esse tipo de reação é denominada de imunidade desencadeada por MAMP (MTI – MAMP Trigger Immunity) ou imunidade desencadeada por DAMP (DTI – DAMP Trigger Immunity)(JONES, DANGL, 2006).

2.3.2 Imunidade Desencadeada por Efetor

Patógenos mais adaptados possuem mecanismos para burlar essa primeira barreira de defesa vegetal de forma a evitar seu reconhecimento pela planta. Para tanto, esses organismos utilizam moléculas efetoras, cuja função consiste em “alterar a estrutura, o metabolismo, ou a regulação hormonal da planta conferindo vantagem ao patógeno” (TAIZ et al., 2017).

As moléculas efetoras são liberadas no citoplasma da célula vegetal pelo patógeno e não são reconhecidas pelas proteínas PRRs, localizadas na membrana. Para melhor se protegerem ao ataque desses patógenos as plantas possuem uma segunda barreira de defesa, que consiste no reconhecimento desses efetores por

meio de receptores especializados, localizados na membrana ou no interior do citoplasma. Essa segunda linha de defesa denomina-se imunidade desencadeada por efector (ETI – Effector Trigger Immunity). Esses receptores são codificados por um grupo de genes denominados genes de resistência (genes R). Dentre os produtos dos genes R, o grupo mais conhecido é o de receptores com domínios de sítio de ligação ao nucleotídeo-repetição rica em leucina (NBS-LRR – nucleotide binding site-leucine rich repeat). Esses receptores encontram-se livres no citoplasma ou ligados a proteínas e permanecem inativos na ausência de efetores (CUI, TSUDA, PARKER, 2015).

Para que a infecção patogênica tenha sucesso, os efetores devem se ligar a proteínas celulares que, justamente por apresentarem sítio de ligação para as moléculas efectoras, são denominadas proteínas *guardie* (KHAN, SUBRAMANIAM, DESVEAUX, 2016). Quando há uma resposta de defesa os receptores NBS-LRR ligam-se às proteínas *guardie* (hipótese guarda) (DANGL, JONES, 2001), ou a proteínas estruturalmente semelhantes (hipótese chamariz) (VAN DER HOORN, KAMOUN, 2008), e tornam-se ativas. Uma vez ativadas, esses receptores desencadeiam uma sequência de reações que darão início às respostas de defesa (CESARI, 2017).

2.3.3 Respostas de Defesa Localizadas

A reação típica desencadeada pela planta após a identificação de um organismo patogênico é a rápida morte das células adjacentes ao sítio de infecção, um efeito conhecido como resposta de hipersensibilidade. Uma vez que as células infectadas estão mortas, o desenvolvimento do patógeno no interior do tecido vegetal é inibido e o restante da planta continua intacta. Esse tipo de reação é decorrente do aumento dos níveis intracelulares de EROs e óxido nítrico (NO), um dos primeiros eventos que ocorrem nas células infectadas após a detecção do patógeno (LEHMANN et al., 2015).

Outras reações de respostas consistem no aumento da síntese de lignina ou calose como medida física para deter o avanço do patógeno. Do mesmo modo, peptídeos com ação antimicrobiana também são sintetizados, bem como outros metabólitos secundários conhecido como fitoalexinas (STANGARLIN et al., 2011).

As fitoalexinas constituem um grupo quimicamente diverso de metabólitos secundários definidos como: “compostos antimicrobianos de baixo peso molecular

que são sintetizados e acumulados na planta após a exposição a um microrganismo” (WALTERS, NEWTON, LYON, 2014). Esses compostos, no entanto, diferem dos peptídeos antimicrobianos e variam de acordo com a família botânica. Em leguminosas por exemplo, as fitoalexinas são isoflavonóides, enquanto nas solanáceas, são sersquiterpenos. Além de peptídeos e fitoalexinas, as plantas também produzem um grupo específico de proteínas, as quais são detectáveis no tecido vegetal apenas sob o ataque de patógenos. A essas proteínas denomina-se proteínas relacionadas a patogênese (PRP) (TAIZ et al., 2017).

2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Além das respostas locais, após serem expostas a um agente indutor, as plantas podem ativar os mecanismos de defesa mesmo em regiões distantes do sítio de infecção. Tal habilidade é denominada resistência induzida (RI) e pode ser dividida entre resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI) (WALTERS, RATSEP, HAVIS, 2013). A RSA é ativada em resposta ao ataque de patógenos que promovem lesões necróticas e é mediada principalmente por processos dependentes do ácido salicílico (AS) (SPOEL, DONG, 2012). A RSI é ativada como resultado da colonização das raízes das plantas por bactérias promotoras de crescimento e sua sinalização é mediada principalmente pelo ácido jasmônico (AJ) e pelo etileno (ET) (THAKUR, SOHAL, 2013).

2.4.1 Resistência Sistêmica Adquirida (RSA)

A resistência sistêmica adquirida (RSA) é um processo no qual a planta, após ser invadida por um patógeno, ativa seus mecanismos de defesa não só no local de infecção mas em todos os demais órgãos, imunizando-os contra futuros ataques (OLIVEIRA, VARANDA, FÉLIX, 2016). Esse mecanismo funciona através de um processo de sinalização iniciado no sítio de infecção e conduzido até locais mais distantes da planta, preparando os tecidos vegetais para respostas mais rápidas e eficientes ao ataque de patógenos (SHAH et al., 2014).

A sinalização ocorre principalmente pelo floema. Entre as principais moléculas sinalizadoras da RSA estão o AS e componentes de sua rota metabólica como o ácido metil-salicílico (AMS), além de compostos como ácido azelaico, dihydroabetalinal e glicerol-3-fosfato (G3P) (KACHROO, ROBIN, 2013). Os sinais móveis da RSA são gerados dentro de 4 a 6 horas após a primeira infecção e a

resistência pode permanecer por dias (KACHROO, ROBIN, 2013). Os resultados dessa indução incluem a produção sistêmica de AS e de PRP.

2.4.2 Hormônios Relacionados a Resistência

Hormônios vegetais como etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido indol acético (AIA), giberilina (GE), citocinina (CT), brassinosteróides e NO podem estar associados aos processos de sinalização de defesa, sendo os hormônios AS e AJ considerados os principais reguladores da imunidade vegetal (WALTERS, NEWTON, LYON, 2014). O ataque de organismos patogênicos ou a colonização do sistema radicular por microrganismos benéficos induzem a produção local e sistêmica desses hormônios, e a aplicação exógena dessas moléculas pode, também, induzir a RSA. As respostas de defesa são mediadas pelo aumento da concentração ou da sensibilidade a esses hormônios (VIDHYASEKARAN, 2015).

De maneira geral, o AS está associado ao aumento da resistência contra patógenos biotróficos, enquanto as rotas de defesa desencadeadas pelo AJ garantem maior resistência a patógenos necrotróficos ou hemibiotróficos (GLAZEBROOK, 2005). Contudo, durante a sinalização hormonal, as interações entre o AS e o AJ podem ser sinérgicas ou antagônicas, o que permite a planta regular o tipo de resposta mais apropriada (WALTERS, HEIL, 2007). Em resumo: “a composição e o tempo de resposta da mistura hormonal produzida define a resistência ou a susceptibilidade do tecido vegetal frente a um organismo invasor” (WALTERS, NEWTON, LYON, 2014).

O AS é um composto fenólico sintetizado a partir do corismato por duas vias metabólicas distintas: a rota da fenilalanina, mediada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL-phenylalanine ammonia lyase), e a rota do isocorismato, mediada pela isocorismato sintase (ICS) (CHEN et al., 2009). As respostas de defesa ligadas ao AS iniciam quando o hormônio se liga a seu receptor: a proteína NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*), esta, por sua vez, será transferida para o núcleo celular e resultará na degradação de proteínas que impedem a expressão de genes de defesa (YAN, DONG, 2014).

A PAL desempenha um papel fundamental na defesa vegetal. A expressão de genes que codificam a PAL, por exemplo, aumentam significativamente durante a interação planta-patógenos, sendo que a inibição da sua expressão acarreta em plantas mais suscetíveis (AN, 2011). Cultivares de tomate resistentes ao ataque de

Ralstonia solanacearum apresentam altos níveis de atividade da PAL (VANITHA, NIRANJANA, UMESHA, 2009). A aplicação de AS, AJ e quitosana, bem como da própria fenilalanina, também aumentam a atividade da PAL (BAHADUR et al., 2012; MANDAL, 2010).

Além da biossíntese de AS, a PAL dá início à rota dos fenilpropanóides, a qual não só leva à produção de fitoalexinas (HOSSAIN et al., 2018) mas também à biossíntese de lignina através da enzima o-metiltransferase (OMT), fornecendo maior proteção contra patógenos (KOPYCKI et al., 2008).

O AJ é derivado de moléculas de lipídios localizadas na membrana plasmática, sendo sintetizado a partir da rota da biossíntese das oxilipinas que tem como precursor o ácido α -linoleico (ROBERT-SEILANIANTZ, GRANT, JONES, 2011). A síntese do AJ tem início com a peroxidação do ácido α -linoleico pela enzima lipoxigenase (LOX). Em seguida, a enzima aleno óxido sintase (AOS) converte o produto da LOX em um aleno óxido altamente instável. Esse aleno óxido é, por meio da aleno oxido ciclase (AOC), convertido em cis-(+)-OPDA que será metabolizado em AJ (KONGRIT et al., 2007).

Quando os níveis de AJ estão baixos, não há expressão de genes de defesa, uma vez que estes se encontram ligados a um grupo de família de proteínas JAZ (Jasmonate Zim-Domain) que acabam por reprimir a transcrição gênica. Para ativar as respostas de defesa, o AJ precisa primeiramente ser convertido em um conjugado de aminoácidos como o ácido jasmônico isoleucina (AJ-Ile). Essa etapa é mediada pelas proteínas de resistência ao ácido jasmônico (JAR- Jasmonic Acid Resistance), uma família de enzimas essenciais para a ativação de respostas ao AJ. O AJ-Ile, por sua vez, iniciará em uma cadeia de reações que irá culminar na degradação das proteínas JAR, liberando o fator de transcrição MYC2, responsável pela transcrição dos genes de resposta ao AJ, dando início às respostas de defesa (DAR et al., 2015; ROBERT-SEILANIANTZ, GRANT, JONES, 2011).

2.4.3 Proteínas Relacionadas a Patogênese (PRP)

Proteínas RP são definidas como proteínas encontradas em níveis muito baixos em tecidos saudáveis, ou até mesmo incapazes de serem detectadas, mas cujo acúmulo foi demonstrado sob condições patológicas (SELS et al., 2008). Tais proteínas podem ser produzidas pela planta logo após o ataque de vírus, viróides, bactérias e fungos, ou induzidas pela aplicação de produtos químicos como os

hormônios ET, AJ e AS (BALASUBRAMANIAN et al., 2012).

As PRPs foram isoladas pela primeira vez em folhas de tabaco que apresentavam reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do tabaco (VMT) (VAN LOON, VAN KAMMEN, 1968), sendo posteriormente relatadas em mais de 13 famílias de plantas quando infectadas por oomicetos, fungos, bactérias, vírus, viróides ou nematóides (VAN LOON, PIETERSE, 2006). Atualmente as PRPs são classificadas em 17 famílias (Tabela 2.1) de acordo com sua atividade biológica, propriedade físico-químicas e homologia (FERNANDES et al., 2013).

Tabela 2.1. Famílias descritas de proteínas relacionadas à patogênese em plantas.

Família	Propriedades
PR-1	Antifúngica
PR-2	B-1,3- glucanase
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV e VII
PR-4	Quitinase tipo I e II
PR-5	Osmatina
PR-6	Inibidor de protease
PR-7	Endoproteinase
PR-8	Quitinase tipo III
PR-9	Peroxidase
PR-10	Proteínas semelhantes à ribonuclease
PR-11	Quitinase tipo V
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas de transferência de lipídios
PR-15	Oxalato oxidase
PR-16	Proteínas semelhantes à oxalato oxidase
PR-17	Desconhecida

Fonte: adaptado de Sels et al. (2008)

Os mecanismos de ação das PRPs sobre os microrganismos patogênicos podem ser diretos ou indiretos dependendo do tipo de atividade desempenhada. As PRPs podem ter ação hidrolítica, podem agir por toxicidade direta, por permeabilização da membrana plasmática ou até mesmo na sinalização dos

processos de defesa. A ação direta dessas proteínas constitui na inibição do desenvolvimento dos patógenos, como o caso das quitinases e glucanases que degradam a parede celular de fungos, ou das osmatinas, defensinas, tioninas e as proteínas de transferência de lipídios que atuam na permeabilização da membrana plasmática (VAN LOON, PIETERSE, 2006). As PRPs também agem de forma indireta podendo prevenir a penetração de patógenos, oxidar os componentes da parede celular vegetal pela ação das peroxidases (acarretando em outras respostas de defesa), ou agir na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro (STANGARLIN et al., 2011).

Apesar das interações entre os hormônios de defesa vegetal resultarem em complexas respostas, ambos, o AS e AJ, podem induzir a expressão de genes que codificam PRPs (VIDHYASEKARAN, 2015). Entre as 17 famílias de PRPs, os genes relacionados a expressão de PR-1, PR-2 e PR-5 são comumente utilizados como genes marcadores da RSA mediada pelo AS (CAO et al., 1994; MOLINARI, FANELLI, LEONETTI, 2014).

As proteínas PR-1 estão entre as mais importantes proteínas relacionadas a defesa vegetal, podendo constituir 1-2% do total de proteínas encontradas na folha. Proteínas PR-1 são divididas entre ácidas e básicas, e são universalmente conhecidas como marcadores moleculares da RSA, uma vez que os níveis de transcrição dos genes que as codificam aumentam significativamente e de forma sistêmica, tanto sob estresses bióticos quanto abióticos (EDREVA, 2005). Essas proteínas estão também ligadas à reação de hipersensibilidade, embora sua função não esteja claramente definida. Além de aumentarem substancialmente durante uma infecção patogênica, a superexpressão de proteínas PR-1 resulta em plantas mais resistentes ao ataque de diversos patógenos (BREEN et al., 2017). A aplicação exógena de elicitores, AS e AJ também induzem a expressão de genes PR-1 (CHINNASRI et al., 2016).

As enzimas β -1,3-glucanases, integrantes da família PR-2, hidrolisam as ligações β -1,3-glicosídicas de β -glucanas resultando em glucose e polissacarídeos. Uma vez que a β -glucana é um importante componente da parede celular de muitos fungos patogênicos, essas enzimas apresentam relativa importância na defesa vegetal (BAUERMEISTER et al., 2010; STANGARLIN et al., 2011). As β -1,3-glucanases desempenham dois papéis na proteção de plantas contra patógenos: o primeiro ocorre de forma direta através da lise dos componente estruturais da

parede celular do patógeno impedindo a sua proliferação no tecido vegetal; o segundo tipo de atividade ocorre de forma indireta por meio da ativação de outras respostas de defesa da planta, uma vez que os oligômeros liberados após a reação enzimática, como o β -1,3 e 1,6-D-glucano, são reconhecidas pelas PRPs da célula vegetal (BERTOLDO, MAZARO, 2018).

As proteínas da família PR-5 são muito semelhantes à proteína taumatina isolada de *Thaumatococcus danielli* e, por isso, são muitas vezes descritas como proteínas semelhantes a taumatina (PST). As PR-5 são encontradas em vários grupos de plantas superiores, estando amplamente associadas à resposta contra fungos e estresses abióticos (TACHI et al., 2009). A atividade antifúngica das proteínas PR-5 se baseiam na permeabilidade da membrana plasmática, enfraquecimento da parede celular, plasmólise e a ativação do sistema de sinalização MAP quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases* - Proteína-quinases ativadas por mitógenos), ativando indiretamente outras repostas de defesa (RATHER et al., 2015). Plantas de amora modificadas geneticamente para superexpressar genes PR-5 apresentaram menor susceptibilidade a *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum dematium* (DAS et al., 2011). Da mesma forma, plantas de soja transgênicas, também capazes de superexpressar genes PR-5 apresentaram considerável aumento de resistência ao ataque de *Septoria glycines*, *Microphaera difusa* e *P. pachyrhizi* (SUBRAMANYAM et al., 2012).

2.4.4 INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DE *P. PACHYRHIZI*

Atualmente vários compostos são conhecidos por ativar os mecanismos de defesa vegetal, como acibenzolar-S-metil (ASM), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), e o ácido Beta-aminobutírico (BABA). Muitos desses compostos são produtos comerciais já estabelecidos no mercado (SREEJA, 2014).

O uso de compostos indutores de resistência tem demonstrado efeito positivo no controle de *P. pachyrhizi* em plantas de soja sob ambiente controlado. Srivastava et al. (2011) concluíram que a utilização de sacarina, tanto em aplicação foliar quanto no solo, induziu a RSA em plantas de soja, reduzindo a severidade da FAS. Entretanto, Carvalho et al. (2013) e Barros (2011) utilizando indutores de resistência já consolidados no mercado não conseguiram ativar os mecanismos de defesa contra *P. pachyrhizi*, resultando em uma alta incidência da doença, bem como uma

baixa produtividade. Tais contradições demonstram que diferentes compostos ativam diferentes mecanismos no sistema de defesa vegetal e que podem ou não ser eficientes no controle da FAS. Dessa forma, é de grande importância a busca por compostos capazes de induzir esses mecanismos. A obtenção desses compostos bioativos através do metabolismo secundário de microrganismos, com destaque às bactérias do gênero *Pseudomonas*, tem sido uma alternativa promissora (SIMIONATO et al., 2017).

2.5 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NO CONTROLE DE DOENÇAS

A *P. aeruginosa* é uma espécie que se destaca pela sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos (SIMIONATO et al., 2017). Entre esses metabólitos se encontram fenazinas, indolinonas, antibióticos, peptídeos, glicopeptídeos, lipídios e compostos alifáticos (de OLIVEIRA et al., 2016).

Trabalhando com metabólitos secundários de *P. aeruginosa* cepa LV vários autores foram capazes de identificar compostos bioativos como o ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), capaz de inibir o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* (SIMIONATO et al., 2017), a fenazina-1-carboxiamida (PCN) a qual apresentou ação frente a cepas Gram positivas multirresistentes (CARDOZO et al., 2013), e um composto organometálico (OAC), que possui ação frente a fitopatógenos como *Xanthomonas citri* pv. *citri* e *X. axonopodis* (de OLIVEIRA et al., 2011; LOPES et al., 2012).

A PCA é uma molécula pertencente à família das fenazinas, um grupo de substâncias heterocíclicas aromáticas produzidas principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* por meio de seu metabolismo secundário. Devido a sua atividade antimicrobiana e a sua baixa toxicidade em humanos, a PCA foi registrada em 2011 pelo ministério da agricultura da China como um novo fungicida biologicamente sintetizado denominado “Shenqinmicina” (ZHOU et al., 2016; XU et al., 2015). Entre os grupos de microrganismos patogênicos controlados pela PCA encontram-se *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* entre outros (PUOPOLO et al., 2013).

Pertencente, também, à família das fenazinas, a PCN apresenta um amplo espectro de controle de microrganismos patogênicos, atuando principalmente na mitocôndria e na parede celular de fungos (XIANG et al., 2018). A PCN tem

demonstrado ser capaz de induzir a resistência em plantas. Ma et al. (2016) demonstraram que a aplicação de PCN no solo foi capaz de induzir a resistência sistêmica em plantas de arroz e de feijão, reduzindo a severidade de *Magnaporthe oryzae* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente. O mesmo ocorreu quando as plantas foram inoculadas com *Pseudomonas* sp. CMR12a, uma cepa capaz de sintetizar PCN (XIANG et al., 2018). A aplicação de PCN produzida pela *P. aeruginosa* cepa LV demonstrou ser capaz de aumentar a atividade de enzimas responsáveis pela defesa vegetal em plantas de tomate (MUNHOZ et al., 2017), indicando seu potencial para a proteção de plantas.

3 Artigo: Metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* como indutores de genes de resistência em soja

RESUMO

A Ferrugem Asiática da Soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é responsável por grandes danos à cultura, podendo levar a perdas de até 90% da produção. Seu controle é realizado principalmente pela aplicação de fungicidas, o que aumenta os custos de produção além de apresentar redução de eficiência na medida que novas cepas resistentes do fungo surgem. Dessa forma, o desenvolvimento de novas moléculas aliado a novas estratégias como a ativação do sistema de defesa da planta é essencial para aumentar a eficiência de controle da FAS e impedir o desenvolvimento de resistência. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de quatro compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV de induzir a expressão de genes de resistência em plantas de soja e de seu uso no patossistema soja-*P. pachyrhizi*. Os compostos produzidos foram extraídos com diclorometano e purificados por cromatografia líquida a vácuo e cromatografia flash. Para os experimentos foi utilizado a fração semi-purificada F4A e os metabólitos fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxiamida (PCN) e organometálico (OAC). No teste *in vitro* 10 µg mL⁻¹ de F4A reduziu em 54% a germinação de esporos, enquanto 100 µg mL⁻¹ inibiu completamente sua germinação. No experimento de expressão gênica, apenas o composto OAC foi capaz de induzir a expressão dos genes de defesa, entre os quais a PAL, OMT e PR-2. Altos níveis de expressão foram obtidos em 24 e 72 horas após a aplicação do composto, mas não houve expressão após 168 horas. No teste *in vivo* a aplicação de 2 e 20 µg mL⁻¹ de F4A reduziu a severidade em 31.8 e 41.5% respectivamente, enquanto a frequência de lesões foi reduzida em 32%. A concentração de 60 µg mL⁻¹ reduziu a severidade em 50.2%, e 5 µg mL⁻¹ do OAC reduziu em 33.8%. O teste *in vitro* demonstrou que os metabólitos da *P. aeruginosa* cepa LV são capazes de controlar efetivamente a FAS, enquanto os testes em plantas de soja demonstraram que a correta formulação entre as concentrações de cada molécula pode resultar no controle efetivo da FAS *in planta*.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Elicitores. Metabólitos secundários. SAR.

Use of *Pseudomonas aeruginosa* metabolites as resistance genes inducers in soybean.

ABSTRACT

Asian Soybean rust (ASR), caused by *Phakopsora pachyrhizi*, is responsible for major damage to the crop, which can lead to production losses up to 90%. Its control is carried out mainly by the use of fungicides, which increase production costs and may lose its efficiency by the development of resistant fungal strains. Thus, the development of new molecules allied to new strategies such as the activation of the plant defense system is essential to increase ASR control efficiency and prevent the development of resistance. The objective of this study was to evaluate the ability of four extracellular compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain in inducing defense related gene expression in soybean plants and its use in the Soybean-*P. pachyrhizi* pathosystem. The compounds were extracted with dichloromethane and purified by Vacuum Liquid Chromatography and Flash Chromatography. For the experiments was used the semi-purified fraction F4A and the metabolites phenazine-1-carboxylic acid (PCA), phenazine-1-carboximide (PCN) and organocouper (OAC). In the *in vitro* test 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of F4A reduced spore germination by 54%, while 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ completely inhibited germination. In the gene expression experiment, only OAC was able to induce defense related gene expression, including PAL, OMT and PR-2. High levels of expression were obtained at 24 and 72 hours after the application, not remaining up to 168 hours. In the *in vivo* test the application of 2 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of F4A reduced the severity in 31.8% and 41.5% respectively, while the frequency of lesions was reduced by 32%. The concentration of 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PCA reduced ASR severity by 50.2%, and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of OAC decreased severity by 33.8%. The *in vitro* test demonstrated that the metabolites produced by *P. aeruginosa* LV strain are able to effectively control ASR, while the tests in soybean demonstrated that the correct formulation between the concentrations of each molecule may result in ASR control *in planta*.

Key words: Bioactive compounds. Elicitors. Secondary metabolites. SAR.

3.3 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja (FAS) é causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd, é atualmente a doença mais severa que acomete a cultura (LANGENBACH et al., 2016). Seu alto potencial de dano pode gerar perdas de até 90% quando medidas de controle não são utilizadas (GODOY et al., 2016), o que faz com que a FAS seja considerada uma ameaça à segurança alimentar mundial (PENNISE, 2010). O fungo *P. pachyrhizi* infecta 93 espécies de leguminosas de 42 gêneros diferentes (SLAMINKO et al., 2008) e apresenta uma alta diversidade genética, o que dificulta o desenvolvimento de plantas resistentes (YAMAOKA, 2014). Por essa razão, a principal estratégia de controle da FAS é através da utilização de fungicidas sintéticos, o que resulta em um custo anual estimado em US\$ 2,2 bilhões (GODOY et al., 2016). Além disso, o desenvolvimento de cepas da *P. pachyrhizi* resistente às moléculas antifúngicas diminui progressivamente a eficiência dos fungicidas (DUHATSCHEK, SANTOS; FARIA, 2018), despertando, assim, o interesse em novas moléculas e em novas estratégias de controle da doença.

As plantas possuem uma enorme capacidade de defesa contra microrganismos patogênicos através de um sistema de defesa altamente adaptado (RAMIREZ-PRADO et al., 2018). Essa complexa rede de defesa conta com mecanismos pré-formados de natureza estrutural ou química, e com a produção, mediante ativação, de fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese (PR) e espécies reativas de oxigênio, que resultam em reação de hipersensibilidade (HR), explosão oxidativa e fortalecimento da parede celular (STANGARLIN et al., 2011).

Além de respostas imediatas, após um ataque localizado as plantas ativam suas defesas de forma sistêmica, preparando-se contra futuros ataques (MARTINEZ-MEDINA et al., 2016). Esse fenômeno é conhecido como Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (WALTERS, RATSEP, HAVIS, 2013).

A RSA pode ser ativada após o ataque de um microrganismo ou através de um agente indutor biótico ou abiótico, o que levará ao aumento dos níveis de ácido salicílico e na produção de proteínas PR, imunizando toda a planta contra ataques futuros (OLIVEIRA, VARANDA, FÉLIX, 2016). Esse mecanismo ocorre por meio de um processo de sinalização iniciado no sítio de infecção, ou de indução, que é conduzido até locais mais distantes da planta, preparando os tecidos vegetais para respostas mais rápidas e eficientes ao ataque de patógenos (SHAH et al., 2014).

Vários compostos químicos são conhecidos como indutores da RSA, como acibenzolar-S-metil (ASM), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), e o ácido beta-aminobutírico (BABA).

Os microrganismos são uma grande fonte de compostos indutores (BUENSANTEAI et al., 2008; DAYAN, CANTRELL, DUKE, 2009; RAMESH SUNDAR et al., 2008), com destaque às bactérias do gênero *Pseudomonas* (HERMAN, DAVIDSON, SMART, 2008; VAN WEES, VAN DER ENT, PIETERSE, 2008). Munhoz et al. (2017) demonstraram que a aplicação de metabólitos secundário de *P. aeruginosa* cepa LV foi capaz de induzir a resistência em plantas de tomate ao ataque de *Pectobacterium carotovorum* através do aumento da produção de enzimas relacionadas a defesa vegetal como peroxidases e a fenilalanina amônia liase (PAL). Pistori et al. (2018) também utilizaram os mesmos compostos e observaram que sua aplicação em citros induziu a expressão do gene que codifica a proteína PR-2, um dos genes marcadores da RSA, o que reduziu a infecção de *Candidatus Liberibacter*.

Alguns compostos indutores demonstraram ser capazes de ativar os mecanismos de defesa da soja reduzindo os danos causados pela FAS. Srivastava et al. (2011) demonstraram que a aplicação foliar de sacarina induziu a RSA e reduziu a severidade da FAS. Cruz et al. (2013) observaram uma diminuição da severidade da FAS com a aplicação foliar de ASM, bem como através da adição de silicato de cálcio ao solo. Carvalho et al. (2013), no entanto, constataram que a aplicação de ASM não foi suficiente para controlar a ferrugem sob condições de campo, semelhante ao descrito por Barros (2011), o que demonstra a dificuldade em controlar a FAS através da indução de resistência.

Diante do apresentado, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos metabólitos da cepa LV no patossistema Soja-*P. pachyrhizi*. Para tanto foram testadas as seguintes hipóteses: (1) Os metabólitos da *P. aeruginosa* cepa LV induzem a expressão de genes de resistência em soja, e (2) a aplicação dos metabólitos controla infecções causadas por *P. pachyrhizi*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Produção de Metabólitos

Os metabólitos utilizados foram obtidos da bactéria *P. aeruginosa* cepa LV,

isolada de uma lesão de cancro cítrico em um fruto de *Citrus sinensis* cv. Valencia no município de Astorga, Brasil (Rampazo, 2006). Para a produção de metabólitos a cepa foi cultivada em meio ágar nutriente (AN) com adição de 0.01% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de acordo com Munhoz et al. (2017). Os metabólitos produzidos foram extraídos por meio de Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV), conforme descrito por Munhoz et. al (2017), dando origem à fração semi-purificada denominada F4A. As moléculas foram purificadas através de uma Cromatografia Flash (CF) utilizando uma coluna de 10 cm contendo sílica 0.04–0.063 mm. O ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) e o composto organometálico (OAC) foram extraídos com 200 mL de diclorometano + acetato de etila [95:5] enquanto a fenazina carboxamida (PCN) foi extraída com 200 mL de diclorometano + acetato de etila [50:50]. Para a diluir uniformemente as moléculas purificadas em água foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO).

3.4.2 Susceptibilidade dos esporos de *P. pachyrhizi* ao metabólito F4A

Alíquotas de 1 mL de uma concentração de 4×10^4 esporos mL^{-1} de *P. pachyrhizi* foram inoculadas em placas de Petri contendo 1.5% de ágar água e 0.5% de DMSO acrescido de 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A, o controle consistiu apenas na adição de DMSO. Foram realizadas três repetições para cada concentração do metabólito e para o controle. Após 12 horas de incubação a 25°C, foi determinada a porcentagem de germinação dos esporos sob microscopia óptica.

3.4.3 Expressão gênica de plantas de soja tratadas com metabólitos de *P. aeruginosa* cepa LV.

Sementes da cultivar altamente susceptível a ferrugem BRS 184 foram pré-germinadas por 72 horas a 25 °C e então transferidas para vasos de 2 litros preenchidos com solo não esterilizados. As plantas foram mantidas em ambiente controlado com 14 horas de fotoperíodo, 28 °C e 50% UR e regados diariamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados com 5 tratamentos, 3 tempos de coleta e 3 repetições.

A aplicação da fração F4A e dos compostos PCA, PCN, e OAC foi realizada separadamente. Os tratamentos estão resumidos na Tabela 3.1. As concentrações foram definidas de acordo com a concentração referência de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A (concentrações maiores resultam em fitotoxicidade). Foi aplicado 5 mL por planta de

cada tratamento no primeiro e segundo trifólio aos 21 dias após a semeadura. Os tempos de coleta foram: 24, 72 e 168 horas após a aplicação.

Tabela 3.1 - Descrição dos tratamentos utilizados no experimento de indução de resistência.

Tratamento	Produto	Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	H ₂ O + DMSO + óleo mineral	
2	F4A	20
3	PCA	6
4	PCN	5
5	OAC	5

Nota: F4A – fração semi-purificada; PCA - ácido fenazina-carboxilido; PCN – fenazina carboxamida; OAC – composto organometálico.

Para a análise de expressão gênica, coletou-se o 2º trifólio de cada planta após 24, 72 e 168 horas da aplicação. Uma vez destacadas, as folhas foram rapidamente transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C em ultra-freezer. Finalizadas as coletas, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido. Todos os materiais utilizados na etapa de maceração foram previamente tratados com RNase AWAY[®] (Merck).

A extração de RNA foi realizada pelo método de Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo e as instruções do fabricante. Por fim, o RNA foi ressuscitado em H₂O livre de RNase e armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada amostra foi medida em espectrofotômetro Nanodrop.

Tabela 3.2- Oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-qPCR.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'
β -actina F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG
β -actina R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC
PR-1 F	AGAGGCAGAGGTGGGTTCT
PR-1 R	TCACCAACAAAGTTGCCAG
PR-2 F	TGAAATAAGGGCCACGAGTCCAAATG
PR-2 R	ATGGTACATGCAGACTTCGAATGCAGAT
PR-5 F	CTCATGCACCAGTATTCCC
PR-5 R	AAGCTTTGTAGTTGGTCC
PAL F	CAAACATCGGCAGATTACTCC
PAL R	CTGGAATGTCTTGGAGATTGG
OMT F	TGGCTAGTCACTCCATGCTATC
OMT R	AACGAGACACCATCAGCATC

Nota: F4A – fração semi-purificada; PCA - ácido fenazina-carboxilido; PCN – fenazina carboxamida; OAC – composto organometálico.

As amostras foram ajustadas para a concentração final de $3 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e em seguida tratadas com DNase Turbo™ (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o kit Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a realização da PCR em tempo real foi utilizado o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem®), com capacidade de 96 poços. Os oligonucleotídeos utilizados são apresentados na Tabela 3.2. Como controle interno das reações foi utilizado o gene endógeno que codifica β -actina da soja.

3.4.4 Controle de FAS em plantas de soja tratadas com metabólitos de *P. aeruginosa* cepa LV

Para avaliar a capacidade dos metabólitos no controle da FAS foi conduzido um experimento em casa de vegetação na Embrapa Soja - Londrina. O experimento constituiu-se em um delineamento em blocos casualizados onde foram avaliados a aplicação da fração F4A e seus compostos derivados: PCA, PCN e OAC em 3 concentrações cada (Tabela 3.3), totalizando 13 tratamentos com 4 plantas cada. Água destilada com 0.25% de DMSO e 0.25% de óleo mineral foi utilizada como diluentes dos compostos antes de serem aplicados. As concentrações de cada metabólito foram definidas de acordo com testes anteriores.

Tabela 3.3 - Descrição dos tratamentos utilizados no experimento de severidade contendo os produtos utilizados e as respectivas doses.

Tratamento	Produto	Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	H ₂ O	
2	H ₂ O + DMSO + óleo mineral	
3	F4A	0.2
4	F4A	2
5	F4A	20
6	PCA	0,6
7	PCA	6
8	PCA	60
9	PCN	0,5
10	PCN	5
11	PCN	50
12	OAC	0,5
13	OAC	5
14	OAC	10

Sementes da variedade BRS 184 foram semeadas em vasos de 3 litros contendo solo não esterilizado, os vasos foram adubados com o equivalente a 250 Kg ha⁻¹ de NPK 10-10-10. A temperatura foi ajustada para 28 ±1,5 °C e a rega foi realizada diariamente.

Aos 20 dias após a semeadura as plantas foram uniformemente pulverizadas com os compostos (5 mL por planta). A inoculação com esporos de *P. pachyrhizi* foi realizada em 24 horas após a aplicação (haa), por meio de pulverização de uma suspensão de 10⁴ esporos mL⁻¹ na parte abaxial dos folíolos. Após a inoculação as plantas foram então colocadas em câmara úmida utilizando sacos plásticos transparentes de 150 L por 24 h.

Aos 14 dias após a inoculação foram coletados dois folíolos do 2º trifólio de cada planta para análise fenotípica. A frequência de lesões foi avaliada de acordo com o número de lesões observadas em 1 cm² de cada lado da folha. A severidade foi avaliada como a porcentagem da área foliar coberta por lesões causadas pelo fungo. Para tanto, utilizou-se os softwares Photoshop Cs6 e Quant (VALE, FERNANDES, LIBERATO, 2004).

3.4.5 Análise Estatística

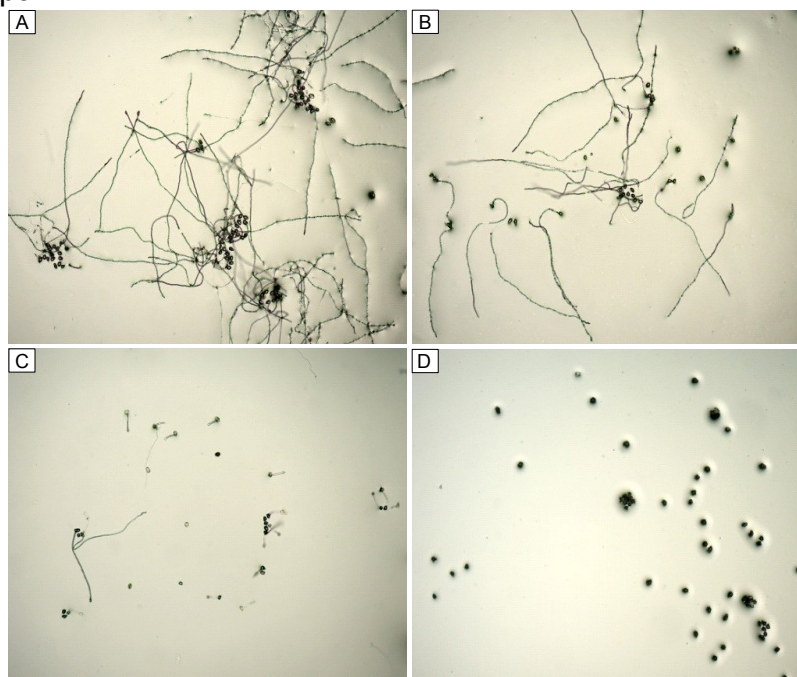
Os dados germinação, severidade e frequência de lesões que atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade segundo os teste de Shapiro-Wilk e Bartlett foram avaliados segundo o teste de Tukey (p<0.05) para verificar a diferença de cada tratamento em relação ao controle através do software RStudio.

Para os resultados de expressão gênica foi realizado o teste t-Student para comparar as mudanças na expressão entre os tratamentos. Os níveis de expressão relativa dos genes entre as amostras foram determinados usando o software 7000 System SDS (Applied Biosystems®).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

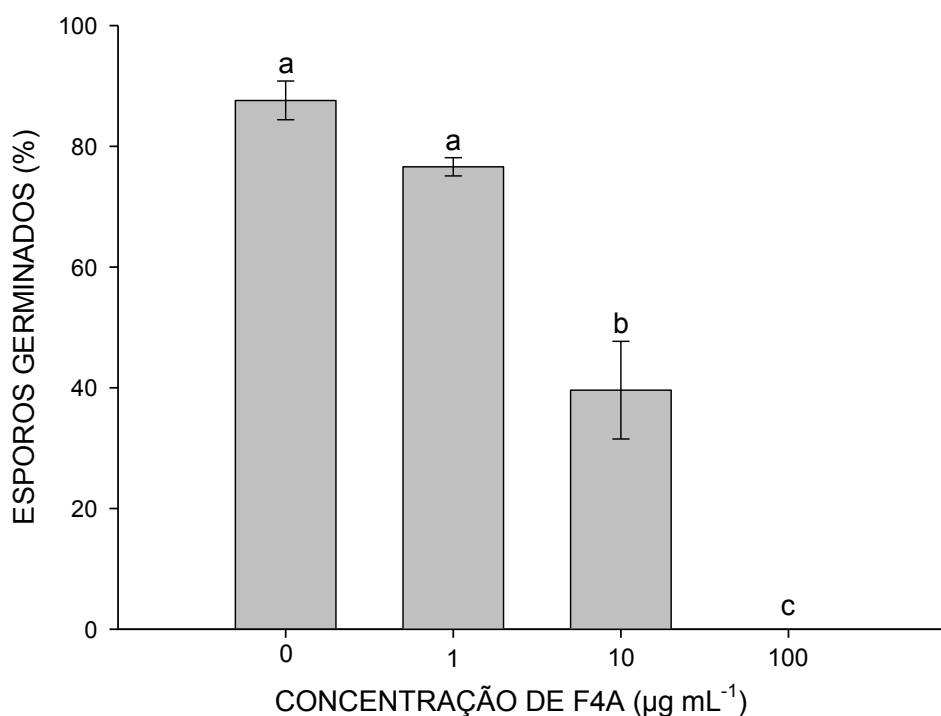
Tendo em vista a capacidade dos metabólitos de *P. aeruginosa* cepa LV de inibir uma ampla variedade de microrganismos fitopatogênicos, desde bactérias (De OLIVEIRA, et al., 2011; LOPES et al., 2012; MUNHOZ et al., 2017; MURATE et al., 2015) até fungos (SIMIONATO et al., 2017), e dos problemas encontrados para o controle da FAS, este estudo buscou avaliar o efeito desses metabólitos no patossistema Soja–*P. pachyrhizi*. Para verificar o efeito *in vitro* dos metabólitos da cepa LV em *P. pachyrhizi* um teste de germinação de esporos foi realizado em ágar contendo diferentes concentrações de F4A (Figura 3.1). Os esporos demonstraram estar viáveis e em boa qualidade, apresentando germinação em 88% do total de observações em relação ao controle com 0.5% de DMSO (Figura 3.2). A adição de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A no ágar foi suficiente para reduzir em 12% a germinação dos esporos. Com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a redução em relação ao controle foi de 54% e uma considerável diminuição no comprimento do tubo germinativo pode ser observado após 12h de incubação (Figura 3.1C). Já a dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu completamente a germinação dos esporos, os quais não demonstraram sinais da emissão do tubo germinativo (Figura 3.1D).

Figura 3.1 – Germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* em ágar-água acrescido de diferentes doses do metabólito F4A produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV.



Nota: Fração semi-purificada F4A adicionadas ao ágar nas concentrações (a) controle, (b) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (d) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

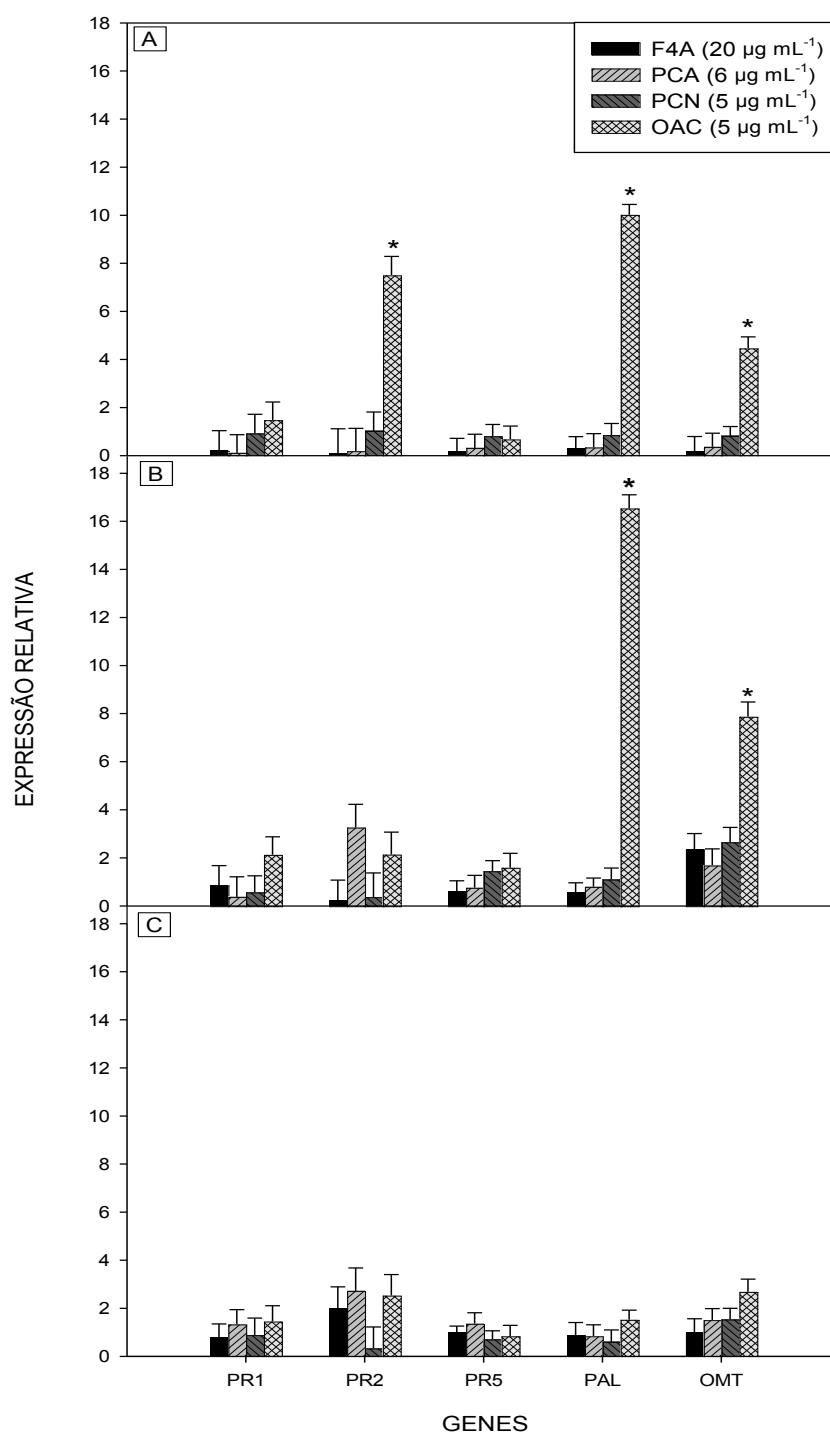
Figura 3.2 – Porcentagem de germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* em ágar-água acrescido de diferentes doses do metabólito F4A produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV.



Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey $p < 0.05$. Barras indicam desvio padrão. CV = 8.6%.

De acordo com o último levantamento realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) a respeito da eficiência dos ingredientes ativos (i.a.) atualmente utilizados para o controle da FAS, os menores índices de severidade são obtidos através da mistura de impirfluxam e tebuconazol, que reduziram a severidade em 62.5% utilizando 30 e 100 g ha^{-1} de ingrediente ativo respectivamente (GODOY et al., 2018). Comparando com a concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que inibiu completamente a germinação dos esporos, seriam utilizados 20 g ha^{-1} de F4A em uma calda de 200 L ha^{-1} , uma concentração 6,5 vezes menor de i.a em relação ao utilizado no levantamento. No caso da dose de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a quantidade de i.a. seria 65 vezes menor. Esses dados demonstram o potencial dos metabólitos produzidos pela cepa LV.

Figura 3.3 - Expressão de genes de defesa em plantas de soja após tratamentos com diferentes metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.



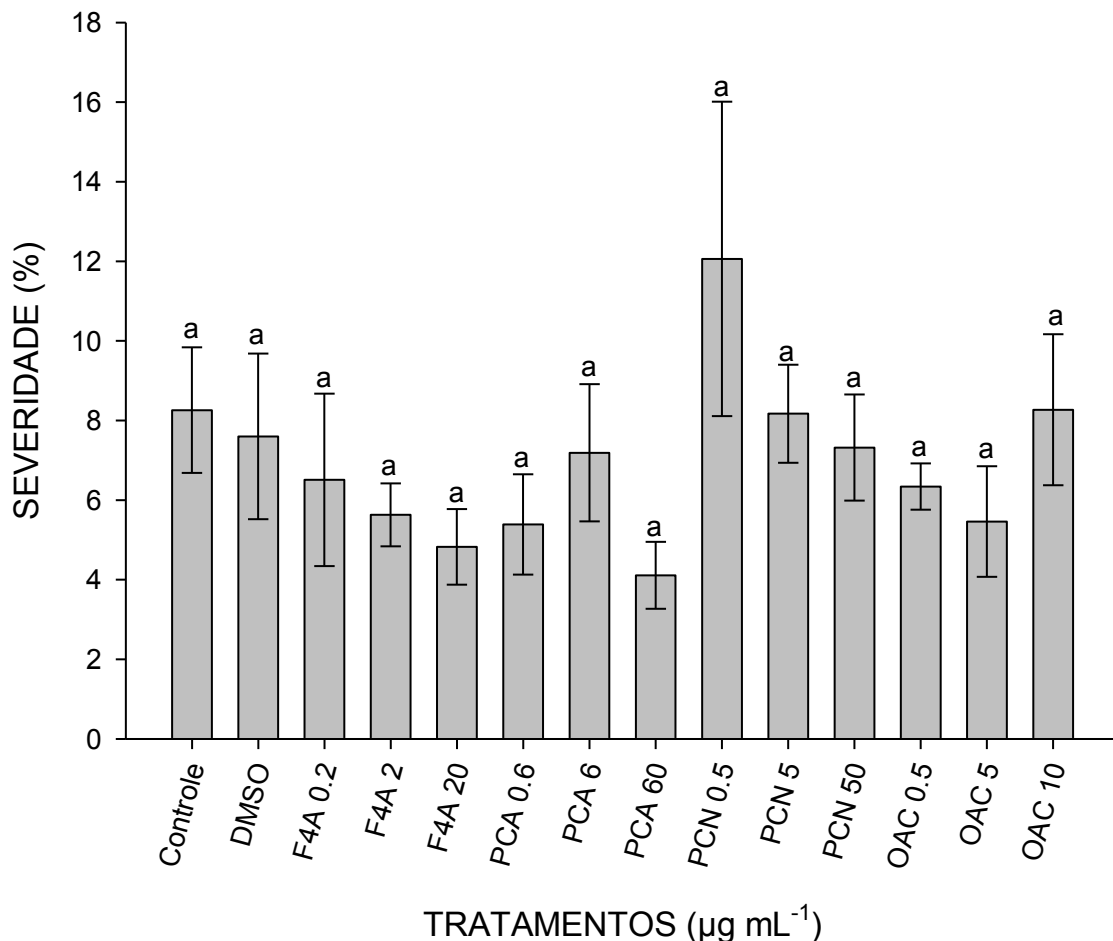
Nota: Expressão dos genes PR-1, PR-2, PR-3, fenilalanina amônia-liase (PAL) e O-metiltransferase (OMT) (a) 24, (b) 72 e (c) 168 horas após a aplicação dos metabólitos. F4A – fração semi-purificada; PCA - ácido fenazina-carboxilido; PCN – fenazina carboxamida; OAC – composto organometálico.

* Indica diferença estatística de acordo com o teste T de Student ($p > 0.05$).

Uma vez constatado o potencial da F4A no controle da FAS, dois experimentos foram realizados para avaliar o efeito da aplicação da fração semi-

purificada F4A e das moléculas que a compõem na interação soja-*P.pachyrhizi*, e para avaliar a capacidade dessas moléculas em induzir a expressão de genes de resistência em soja conforme observado em citros (PISTORI et al., 2018). Simionato et al. (2017) e Oliveira et al. (2016) purificaram e identificaram as principais moléculas contidas na F4A. Entre elas encontra-se o ácido fenazina -1-carboxílico (PCA), que compõem 30% do total da fração, a fenazina caboxamida (PCN) representando 25%, e um composto organometálico (OAC) contendo cobre em sua estrutura e que corresponde, também, a 25% do peso total da fração.

Figura 3.4 - Severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja tratadas com metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.



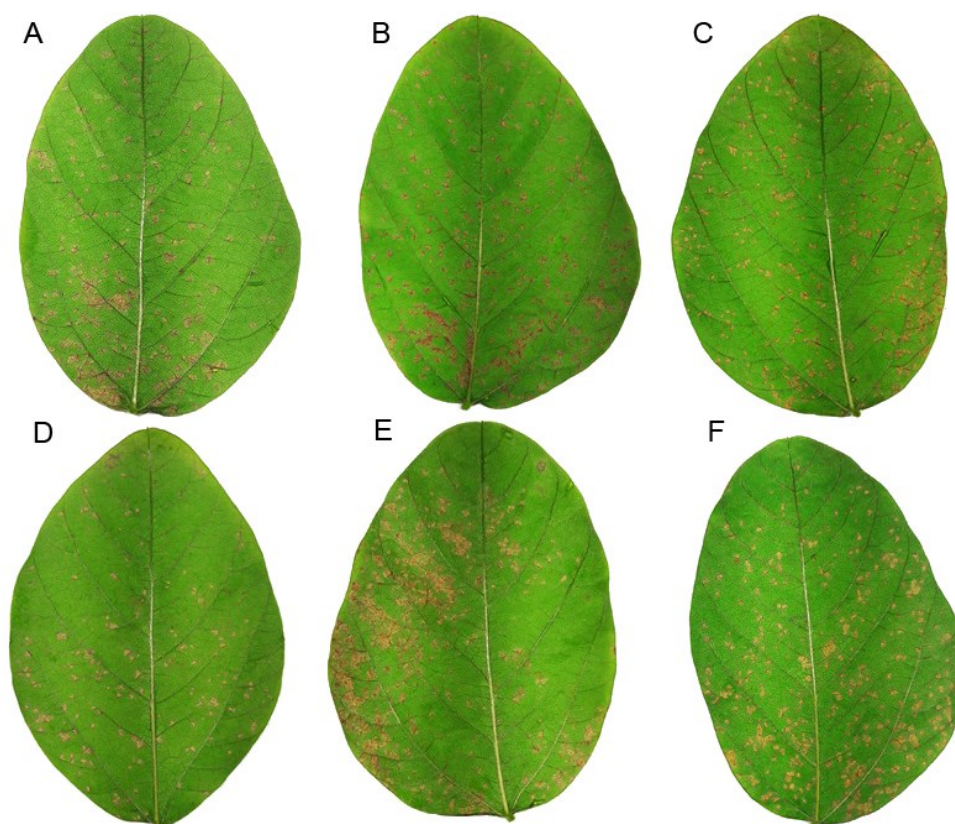
Nota: Controle - H₂O destilada; DMSO – dimetilsulfóxido + óleo mineral; F4A – Fração semi-purificada; PCA - ácido fenazina-carboxílico; PCN – fenazina carboxamida; OAC – composto organometálico. Números a frente as siglas indicam a concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Inoculação realizada 24 horas após a aplicação dos metabólitos. Análise realizada 14 dias após a inoculação.

Letras iguais indicam semelhança estatística de acordo com o teste de Tukey ($p > 0.05$). Barras indicam erro padrão. CV = 61.94%.

Apesar de altas concentrações de F4A terem sido usadas em trabalhos anteriores, chegando até a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em citros (PISTORI et al., 2018), no presente estudo foi utilizado, como concentração máxima $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, devido ao efeito fitotóxico em folhas de soja causado por concentrações superiores. Dessa forma, a concentração das moléculas purificadas foi definida de acordo com sua representatividade na F4A como descrito acima.

Os dados de RT-qPCR mostram que apenas o OAC induziu a expressão dos genes de defesa PR-2, PAL e OMT (Figura 3.3). O gene PR-2 foi expresso apenas 24 horas após a aplicação (haa), onde apresentou uma expressão 8 vezes maior que o controle. Tanto o OMT quanto a PAL aumentaram seu nível de expressão após 24 e 72 horas da aplicação de OAC com maior expressão em 72 haa. Nenhum dos genes analisados teve sua expressão prolongada até 168 haa.

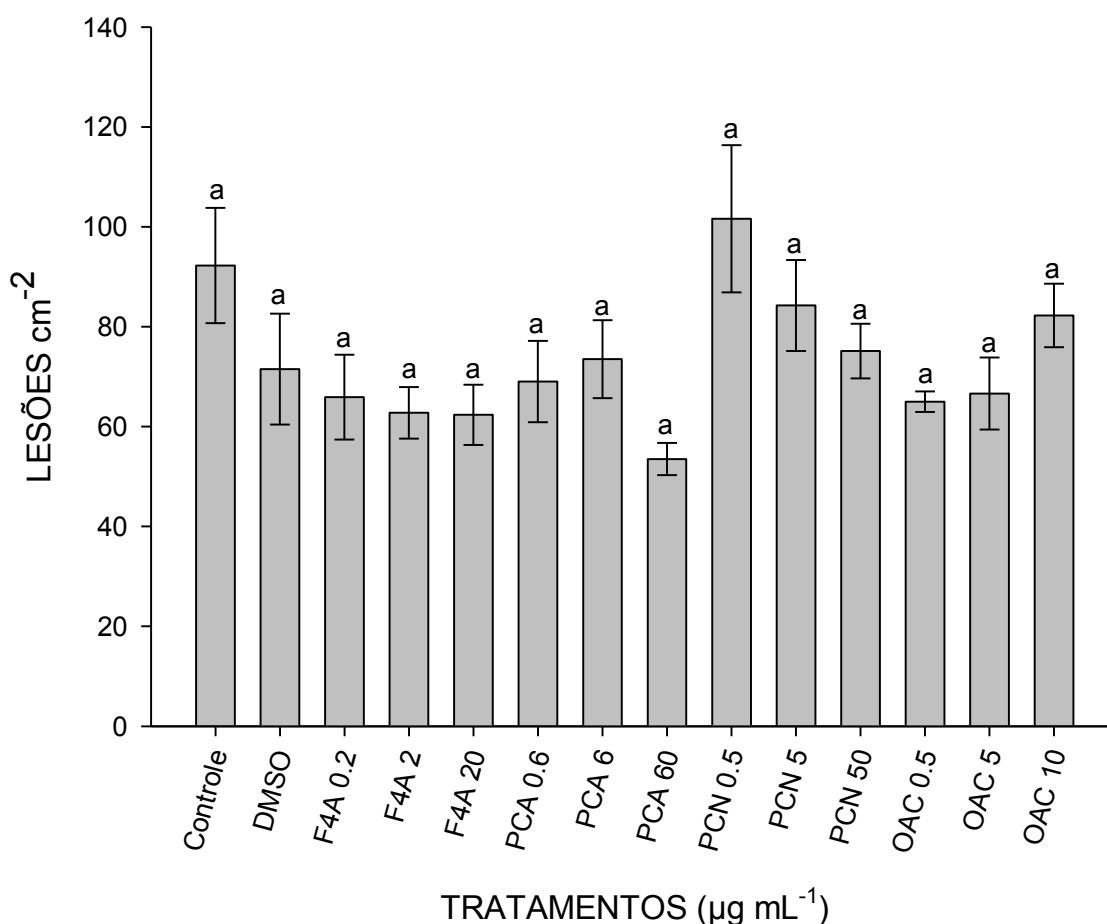
Figure 3.5 – Folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* e pulverizadas com diferentes metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.



$20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A – Fração semi-purificada (A); $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCA - ácido fenazina-carboxílico (B); $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCN – fenazina carboxamida (C); $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OAC – composto organometálico (D); Controle - H_2O destilada (E) e DMSO – dimetilsulfóxido + óleo mineral (F). Inoculação realizada 24 horas após a aplicação dos metabólitos. Análise realizada 14 dias após a inoculação.

Não foi possível detectar diferença entre os tratamentos e o controle no experimento de patogenicidade (Figura 3.4). No entanto, é possível notar um padrão de diminuição nos níveis de severidade conforme aumenta-se a dose dos metabólitos (Figura 3.5). As doses de 2 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A reduziram a severidade em relação ao controle em 31.8 e 41.5%, respectivamente. A aplicação de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PCA reduziu em 50.2% a severidade, e a dose 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PCN reduziu em apenas 11.3%. Para o composto OAC a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu em 33.8% a severidade, enquanto a dose de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não teve efeito na FAS.

Figura 3.6 – Frequência de lesões de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja tratadas com metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sob condições controladas.



Nota: Controle - H₂O destilada; DMSO – dimetilsulfóxido + óleo mineral; F4A – Fração semi-purificada; PCA – ácido fenazina-carboxílico; PCN – fenazina carboxamida; OAC – composto organometálico. Números a frente das siglas indicam a concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Inoculação realizada 24 horas após a aplicação dos metabólitos. Análise realizada 14 dias após a inoculação. Letras iguais indica semelhança estatística de acordo com o teste de Tukey ($p > 0.05$). Barras indicam erro Padrão. CV = 41.5%.

Em relação à frequência de lesões (Figura 3.6) foi observado o mesmo padrão encontrado nos dados de severidade. A aplicação de 2 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A reduziram em 32% o número de lesões e, interessante, a aplicação apenas de água (Controle) apresentou 29% mais lesões que o controle (DMSO + Óleo). 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PCA reduziu a frequência em 42% e o composto OAC reduziu em 29.5 e 27.7% nas doses de 0.5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Diferentemente do constatado em citros, a F4A não induziu a expressão do gene que codifica a B-1,3 glucanase (PR-2) em soja, bem como de nenhum dos demais genes analisados. A redução da severidade e da frequência de lesões obtida com a dose de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi, portanto, o resultado da ação antifúngica, das moléculas que compõem sua formulação, como a PCA e o OAC, conforme observado no teste de germinação de esporos. Munhoz et. al. (2017) constataram que a aplicação de 3.5 e 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PCN em tomate resultou em um aumento da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (PAL), o que possivelmente contribuiu para a redução da severidade de *P. carotovorum*. A aplicação de PCN em plantas de soja, no entanto, não resultou no aumento da expressão de nenhum dos genes de defesa. MA et al. (2016) adicionaram ao solo diferentes concentrações de PCN e observaram que 1 e 0.1 μM de PCN foram suficientes para diminuir a intensidade de infecção de *Magnaphorte oryzae* em arroz, enquanto a adição de 0.001 μM resultou em considerável redução da severidade de *Rhizoctonia solani* em feijão, sendo que concentrações superiores perderam a capacidade elicitora. A concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada no presente estudo equivale a 0.2 μM de PCN, o que, apesar de ter apresentado efeito em arroz e em tomate, não foi capaz de induzir a resistência em leguminosas. Esses dados demonstram que, possivelmente, a concentração de PCN capaz de induzir a resistência em plantas está relacionada com a família a qual a planta o alvo pertence.

As fenazinas constituem um grupo de compostos heterocíclicos produzidos quase exclusivamente por bactérias (CHIN-A-WOENG, BLOEMBERG, LUGTENBERG, 2003). Devido a sua ação antibiótica de amplo espectro, tem sido o mais pesquisado grupo de metabólitos secundários de origem microbiana (PIERSON; PIERSON, 2010). A PCA e a PCN são produzidas principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas do sistema radicular e são essenciais no

biocontrole de diversos fitopatógenos, conforme o relatado para as culturas de trigo (THOMASHOW, WELLER, 1988; YANG et al., 2011), arroz (XU et al., 2015; ZHOU, Lian et al., 2016), tomate (CHIN-A-WOENG et al., 1998) e pimenta (LIU et al., 2007). De acordo com Puopolo et al. (2013), ambos os compostos reduziram o crescimento *in vitro* de *Alternaria alternata*, *B. cinera*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* e *Phytophthora cambiva*.

A PCA constitui um biofungicida comercial denominada “Shenqinmicina”, registrado no ministério da agricultura chinês para o controle de doenças bacterianas (HE, XU, ZHANG, 2007). Por sua origem natural, a PCA apresenta baixa toxicidade e um baixo risco de poluição ambiental (ZHOU, SU, JIANG, 2010). Em fungos, sua aplicação resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na hifa e na desestabilização da mitocôndria, levando a estresses oxidativos e a alterações na permeabilidade da membrana (HUANG et al., 2016; SIMIONATO et al., 2017).

A aplicação das fenazinas em folhas de soja não impediu o desenvolvimento da FAS, mas demonstrou reduzir a severidade e a frequência de lesões em relação ao controle como observado na concentração de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PCA. Lee, Moon e Hwang (2003) obtiveram sucesso em controlar *P. capsici* em pimenta e *Colletotrichum orbiculare* em pepino através da aplicação ectópica de PCA em concentrações acima de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses autores ainda constataram que a concentração inibitória mínima de PCA para a maioria dos fungos fitopatogênicos é maior que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A maior concentração de PCA utilizada nesse estudo é muito menor em relação à utilizada por esses autores. Contudo a redução da severidade e da frequência de lesões obtidas com 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indica que maiores concentrações podem resultar em um adequado controle da FAS. Essa é a primeira vez que que esses metabólitos são testados em soja e desafiados contra um patógeno como a *P. pachyrhizi* e, portanto, futuros estudos devem ser conduzidos a fim de se buscar a concentração ideal de cada composto bem como a mistura entre os compostos que resulte em melhor controle da FAS.

Dentre os principais metabólitos produzidos pela cepa LV apenas o OAC demonstrou induzir a expressão de genes de defesa como PR-2, PAL e OMT. A imunidade vegetal baseia-se no reconhecimento de organismos potencialmente patogênicos (CESARI, 2017). Uma vez reconhecido o patógeno, as plantas iniciam um processo de sinalização célula a célula via rotas de sinalização hormonal e rotas ligadas à biossíntese de fitoalexinas e compostos fenólicos, que frequentemente

resultam na deposição de calose e na produção de moléculas antimicrobianas (HOSSAIN et al., 2018). A rota dos fenilpropanoides constitui uma das mais importantes rotas de defesa vegetal contra patógenos, em especial na resistência da soja a *P. pachyrhizi* (HOSSAIN et al., 2018; LYGIN et al., 2009; PANDEY et al., 2011). A PAL é a primeira enzima da rota dos fenilpropanoides (FRASER, CHAPPLE, 2011), fornecendo precursores para a produção de fitoalexinas como a gliceolina (LYGIN et al., 2009), e para a produção de lignina através da O-metiltransferase (OMT) (FRASER, CHAPPLE, 2011). Tanto a PAL quanto a OMT são expressas em genótipos de soja resistentes a FAS (CHOI et al., 2008; Van DE MORTEL et al., 2007), e são essenciais para a manutenção dessa resistência (COOPER et al., 2014; PANDEY et al., 2011). Curiosamente, apesar do OAC ter demonstrado induzir os principais genes de defesa contra *P. pachyrhizi*, sua aplicação reduziu em apenas 33.8% a severidade da doença em apenas 27.7% da frequência de lesões.

Segundo Choi et al. (2008), a resistência a FAS é uma questão de intensidade e precisão no tempo de expressão dos genes de defesa, o que leva a duas suposições a respeito dos dados observados com a aplicação do OAC: (1) O período da expressão dos genes de resistência não coincidiu com os momentos críticos para estabelecimento do fungo, não impedindo a colonização da planta hospedeira, ou (2) a expressão dos genes não resultou na produção de fitoalexinas ou proteínas antimicrobianas pela planta.

Van de Mortel et al. (2007) demonstraram que genótipos susceptíveis a ferrugem têm um pico de expressão de genes de defesa 12 horas após a inoculação (hai) do fungo, seguido de um segundo aumento em 96 hai, enquanto os genótipos resistentes expressaram esses picos em 12 e 72 hai, coincidindo com os períodos de penetração e formação do haustório (SCHNEIDER et al., 2011), demonstrando que a resistência a FAS depende da antecipação da planta em relação ao patógeno. Elevada expressão de PAL, OMT e PR-2 foi obtida 24 e 72 haa do OAC, indicando que, possivelmente, maiores reduções na severidade poderiam ter sido obtidas com a aplicação do composto simultaneamente ou 48 hai, alinhando, assim, a ativação da defesa vegetal nos mesmos períodos dos genótipos resistentes.

Apesar da forte correlação entre expressão gênica e produção de metabólitos, interferências na atividade enzimática bem como na regulação translacional pode, em alguns casos, desalinhar a relação entre a atividade transcricional e nível de

determinado metabólito (ZELEZNIAK, SHERIDAN, PATIL, 2014). Durante a interação patogênica, de 570 genes expressos e 507 proteínas acumuladas em linhagens resistentes a FAS, Cooper et al. (2011) encontraram apenas 9 correlações entre gene/proteína, demonstrando que o acúmulo de proteínas, e consequentemente de metabólitos, na interação soja-*P. pachyrhizi* é influenciado por outros processos biológico além da transcrição gênica. Dessa forma, a expressão da PAL e da OMT sob a aplicação de OAC pode não ter resultado na produção de metabólitos necessários para impedir o avanço do fungo. Hossain et al. (2018) postularam que a resistência conferida a FAS pelos genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* pode ser dependente de uma ação coordenada de várias enzimas da rota dos fenilpropanoides cuja ação é posterior a PAL, demonstrando a fragilidade da resistência a FAS uma vez que qualquer alteração na atividade de alguma enzima pode resultar em interações compatíveis. Esses dados demonstram a importância de se avaliar a produção final dos metabólitos em conjunto com outras técnicas de análise molecular como a expressão gênica e atividade enzimática, o que permitiria saber com precisão se determinada rota está realmente sendo ativada. A gliciolina, uma fitoalexina produzida pela soja, é um dos produtos finais da rota dos fenilpropanoides e o principal flavonoide na resistência a FAS, sendo produzida em grandes quantidades por genótipos resistentes (LYGIN et al., 2009). Analisar os teores de gliciolina após a aplicação de moléculas elitoras pode ajudar a elucidar o papel de cada molécula na resistência não só da FAS mas também de outras doenças que acometem a cultura da soja.

3.6 CONCLUSÃO

Somente o composto OAC é capaz de induzir a expressão dos genes que codificam as proteínas PR-2, PAL e OMT. Os dados de germinação de esporos, expressão gênica e severidade demonstram que os metabólitos da *P. aeruginosa* apresentam um grande potencial para controlar a FAS, no entanto, futuros estudos devem ser conduzidos de modo a encontrar o melhor momento para a aplicação, bem como a concentração ideal de cada composto e a mistura ideal entre esses compostos que resulte em um satisfatório controle da doença.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Um dos metabólitos da *P. aeruginosa* cepa LV induziu a expressão de genes de resistência em soja e, embora sejam necessários maiores estudos, tanto as moléculas separadas quanto em conjunto na F4A apresentaram promissores resultados no controle da FAS. Conclui-se portanto que futuros estudos devem ser conduzidos com o objetivo de se encontrar a concentração de cada molécula que resulte em melhor controle da FAS a fim de se atingir uma formulação final que resulte no completo controle da doença.

REFERÊNCIAS

- AN, C; MOU, Z. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, New Jersey, v. 53, n. 6, p. 412–428, 2011.
- BAHADUR, A et al. Foliar application of l-phenylalanine and ferulic acids to pea plants: induced phenylalanine ammonia lyase activity and resistance against *Erysiphe pisi*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Oxfordshire, v. 45, n. 4, p. 398–403, 2012
- BALASUBRAMANIAN, V et al. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology Letters**, Berlim, v. 34, p. 1983–1990, 2012.
- BARBOSA, G.F.; CENTURION, M.A.P.C.; FERRAUDO, A.S. Potencial do manejo integrado da ferrugem asiática da soja: severidade da doença, desenvolvimento vegetativo e componentes da produção, cultivar mg/br-46 (conquista). **Bioscience Journal**, Oxford, v. 30, p. 76–89, 2011.
- BARROS, R. Estudo sobre a aplicação foliar de acibenzolar-S-metil para indução de resistência à ferrugem asiática em soja e cercosporiose em milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 519–528, 2011.
- BAUERMEISTER, A. et al. β -1,3-glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75–86, 2010.
- BERTOLDO, E.; MAZARO, S.M. β -1,3 glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.
- BREEN, S. et al. Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. **Trends in Plant Science**. New York, v. 22, n. 10, p. 871-879, 2017.
- BUENSANTEAI, N. et al. Extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced systemic resistance on soybean. **Kasetsart Journal**, New York, v. 42, n. 5, p. 13–26, 2008.
- CAO, H. et al. Characterization of an arabidopsis mutant that is nonresponsive to Inducers of systemic acquired resistance. **The Plant cell**, Rockville, v. 6, p. 1583–1592, 1994.
- CARDOZO, V.F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, Berlim, v. 12, n. 5, p. 1-12, 2013.
- CARVALHO, B.O. et al. Action of defense activator and foliar fungicide on the control of asiatic rust and on yield and quality of soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 198–206, 2013.

CESARI, S. Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. **New Phytologist**, New Jersey, v. 219, n. 1, p. 17–24, 2017.

CHEN, Z. et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Oxfordshire, v. 4, n. 6, p. 493–496, 2009.

CHIN-A-WOENG, T.F.C. et al. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* pcl1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. Radicis-lycopersici. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 11, p. 1069–1077, 1998.

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, Hoboken, v. 157, n. 3, p. 503–523, 2003.

CHINNASRI, B. et al. Induction of pathogenesis-related gene 1 (PR-1) by acibenzolar-s-methyl application in pineapple and its effect on reniform nematodes (*Rotylenchulus reniformis*). **Agriculture and Natural Resources**, New York, v. 50, n. 5, p. 368–373, 2016.

CHOI, H.W.; KLESSIG, D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology**, Berlim, v. 16, n. 232, p. 1–10, 2016.

CHOI, J.J. et al. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional and Integrative Genomics**, Berlim, v. 8, n. 4, p. 341–359, 2008.

COOPER, B. et al. Disruption of Rpp1-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 8, n. 2, p. 1–9, 2014.

COPER B. et al. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 773–783, 2011.

COSTA, A. et al. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 159–166, 2014.

CRUZ, M.F.A. et al. Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean- *Phakopsora pachyrhizi* interaction. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p. 162–172, 2013.

CUI, H.; TSUDA, K.; PARKER, J.E. Effector-Triggered Immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual Review of Plant Biology**, Toronto, v. 66, p. 487–511, 2015.

CUNHA, J.P.A.R.; JULIATTI, F.C.; REIS, E.F. Tecnologia de aplicação de fungicida no controle da ferrugem asiática da soja: resultados de oito anos de estudos em minas gerais e goiás. **Bioscience Journal**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 950–957, 2014.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, Berlim, v. 411, p. 826–833, 2001.

DAR, T.A. et al. Jasmonates counter plant stress: A review. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 115, p. 49–57, 2015.

DAS, M. et al. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. **Transgenic Research**, Berlim, v. 20, p. 231–246, 2011.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 2009.

DE OLIVEIRA, A.G. et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, Cambridge, v. 56, p. 125–131, 2011.

DE OLIVEIRA, A.G. et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, Richland, v. 7, p. 1–12, 2016.

DUHATSCHEK, E.; SANTOS, L.A.; FARIA, C.M.D.R.. Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes da região do centro oeste do Paraná a fungicidas. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193–194, 2018.

EDREVA, A. Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, n. 1–2, p. 105–124, 2005.

FERNANDES, H. et al. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **FEBS Journal**, New Jersey, v. 280, n. 5, p. 1169–1199, 2013.

FRASER, C.M.; CHAPPLE, C. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. **The Arabidopsis Book**, Rockville, v. 9, p. 1–19, 2011.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Toronto, v. 43, p. 205–227, 2005.

GODOY, C.V. et al. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 56–61, 2009.

GODOY, C.V.; GAZZIERO, A.F.; PISA, B.D.L. Brazilian soybean pest management and threats to its sustainability. **Outlooks on Pest Management**, Hertfordshire v. 26, n. 3, p. 113–117, 2015.

GODOY, C.V. et al. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio De Janeiro, v. 51, n. 5, p. 407–421, 2016.

GODOY, C.V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica Embrapa Soja**, Londrina, v. 138, p. 1–6, 2018.

HE, L.; XU, Y.Q.; ZHANG, X.H. Medium factor optimization and fermentation kinetics for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M18G. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 100, n. 2, p. 250–259, 2008.

HERMAN, M.A.B.; DAVIDSON, J.K.; SMART, C.D. induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 11, p. 1226–1232, 2008.

HOSSAIN, M.Z. et al. Soybean leaves transcriptomic data dissects the phenylpropanoid pathway genes as a defense response against *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 132, p. 424–433, 2018.

HUANG, H. et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on the morphological, physiological, and molecular characteristics of *Phellinus noxius*. **Molecules**, v. 21, n. 613, p. 1–10, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Série histórica da estimativa anual da área plantada, área colhida, produção e rendimento médio dos produtos das lavouras, dez. 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>. Acesso em: 10 de jan. 2019.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, Berlim, v. 444, p. 323–329, 2006.

KACHROO, A.; ROBIN, G.P. Systemic signaling during plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 16, n. 4, p. 527–533, 2013.

KHAN, M.; SUBRAMANIAM, R.; DESVEAUX, D. Of guards, decoys, baits and traps: Pathogen perception in plants by type III effector sensors. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 29, p. 49–55, 2016.

KONGRIT, D. et al. Molecular cloning and functional expression of soybean allene oxide synthases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxfordshire, v. 71, n. 2, p. 491–498, 2007.

KOPYCKI J. et al. Biochemical and structural analysis of substrate promiscuity in plant mg²⁺-dependent o-methyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 1, p. 154–164.

LANGENBACH, C. et al. Fighting asian soybean rust. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 797, p. 1–13, 2016.

LEE, J.Y.; MOON, S.S.; HWANG, B.K. Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 59, n. 8, p. 872–882, 2003.

LEHMANN, S. et al. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, New York, v. 112, p. 54–62, 2015.

LI, L. et al. Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity. **Science China Life Sciences**, Berlín, v. 59, n. 9, p. 878–888, 2016.

LIU, H. et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. **Current Microbiology**, New York, v. 54, n. 4, p. 302–306, 2007.

LOPES, L.P. et al. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**, Berlín, v. 37, n. 4, p. 233–238, 2012.

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

MA, Z. et al. Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 8, n. 5, p. 896–904, 2016.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 47, p. 8038–8047, 2010.

MARTINEZ-MEDINA, A. et al. Recognizing plant defense priming. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 818–822, 2016.

MEHTA, Y.R. et al. Systemic Acquired Resistance of soybean to soybean rust induced by shale water. **American Journal of Plant Sciences**, Wuhan, v. 06, n. 14, p. 2249–2256, 2015.

MENEGHETTI, R.C. et al. Avaliação da ativação de defesa em soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas. **Ciencia e Agrotecnologia**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 823–829, 2010.

MOLINARI, S.; FANELLI, E.; LEONETTI, P.. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. **Molecular Plant Pathology**, New Jersey, v. 15, n. 3, p. 255–264, 2014.

MORITA, A. et al. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry**, New York, v. 69, p. 147–153, 2008.

MUNHOZ, L.D. et al. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, Oxfordshire, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.

MURATE, L. S. et al. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**, Wuhan, v. 6, n. 03, p. 295–303, 2015.

OLIVEIRA, M. et al. Fosfito e silicato de potássio no controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Pernambuco, v. 10, n. 1, p. 60–65, 2015.

OLIVEIRA, M.D.M.; VARANDA, C.M.R.; FÉLIX M.R. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, Nova York, v. 15, p. 152–158, 2016.

PANDEY, A.K. et al. Functional analysis of the asian soybean rust resistance pathway mediated by Rpp2. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 194–206, 2011.

PENNISI, E. Armed and dangerous. **Science**, v. 327, p. 804, 2010.

PIERSON, L.S.; PIERSON, E.A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 86, n. 6, p. 1659–1670, 2010.

PIETERSE, C.M.J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, Berlim, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

PISTORI, J.F. et al. Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Tropical Plant Pathology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 289–296, 2018.

PUOPOLO, G. et al. Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungi to phenazine-1- carboxylic acid and its chemical derivatives. **Natural Product Research**, Oxfordshire, v. 27, n. 11, p. 956–966, 2013.

RAMIREZ-PRADO, J.S. et al. Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 1–12, 2018.

RAMPAZO, L.G.L., 2004. Avaliação do efeito de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões de cancro cítrico. Universidade Estadual de Londrina, Dissertação de Mestrado, Londrina, Brasil, p. 59.

RATHER, I.A. et al. Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. **Gene**, v. 558, n. 1, p. 143-151, 2015.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Toronto, v. 49, p. 317–343, 2011.

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

SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008.

SHAH, J. et al. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **Plant Journal**, New Jersey, v. 79, n. 4, p. 645–658, 2014.

SIMIONATO, A.S. et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of botrytis cinerea produced by *Pseudomonas aeruginosa*LV strain. **Frontiers in Microbiology**, Richland, v. 8, n. 1102, p. 1–9, 2017.

SLAMINKO, T.L. et al. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 767–771, 2008.

SILIPO, A. et al. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. **Glycobiology**, v. 20, n. 4, p. 406–419, 2010.

SPOEL, S.H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature reviews. Immunology**, Berlim, v. 12, n. 2, p. 89–100, 2012.

SREEJA, S.J. Synthetic plant activators for crop disease management – a review. **International Journal of Thesis Projects and Dissertations**, Lucknow, v. 2, n. 1, p. 19–28, 2014.

SRIVASTAVA, P. et al. Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean : Effects on growth and development. **Crop Protection**, New York, v. 30, n. 6, p. 726–732, 2011.

STANGARLIN, J.R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

SUBRAMANYAM, K. et al. Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. **Planta**, Berlim, v. 236, n. 6, p. 1909–1925, 2012.

SUNDAR, A. et al. Induction of pathogenesis-related proteins in sugarcane leaves and cell-cultures by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. **Biologia Plantarum**, Berlim, v. 52, n. 2, p. 321–328, 2008.

TACHI, H. et al. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v. 47, p. 73–79, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

THAKUR, M.; SOHAL, B.S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 8, p. 3499–3508, 1988.

- VAN DE MORTEL, M. et al. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 887–899, 2007.
- VAN DER HOORN, R.A.L.; KAMOUN, S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The plant cell**, v. 20, n. 8, p. 2009–2017, 2008.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Danvers, v. 44, p. 135–162, 2006.
- VAN LOON, L.C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. **Virology**, New York, v. 40, p. 199–211, 1968.
- VAN WEES, S.C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C.M.J. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 11, n. 4, p. 443–448, 2008.
- VANITHA, S.C.; NIRANJANA, S.R.; UMESHA, S. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of Tomato. **Journal of Phytopathology**, New Jersey, v. 157, n. 9, p. 552–557, 2009.
- VATSA, P. et al. Plant physiology and biochemistry cytosolic calcium rises and related events in ergosterol-treated nicotiana cells. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 764–773, 2011.
- VIDHYASEKARAN, P. **Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity**. 1. ed. Dordrecht: Springer Science, 2015, 473 p.
- WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological & Molecular Plant Pathology**, New York, v. 71, p. 3–17, 2007.
- WALTERS, D.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 2013.
- WALTERS, D.R.; NEWTON, A.C.; LYON, G.D. **Induced resistance for plant defense a sustainable approach to crop protection**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2014. 355 p.
- WELLER, D.M. et al. Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. **Biological Control**, v. 102, n. 4, p. 403–412, 2012.
- XIANG, Y. et al. Effects and inhibition mechanism of phenazine-1-carboximide on the mycelial morphology and ultrastructure of *Rhizoctonia solani*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 147, p. 32–39, 2018.
- XU, S. et al. Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 117, p. 39–46, 2015.

YAMANAKA, N. et al. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 153-162, 2010.

YAMAOKA, Y. Recent outbreaks of rust diseases and the importance of basic biological research for controlling rusts. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 5, p. 375–388, 2014.

YAN, S.; DONG, X. Perception of the plant immune signal salicylic acid. **Current Opinion in Plant Biology**, New York v. 20, p. 64–68, 2014.

YANG, M. et al. Biological control of take-all by Fluorescent *Pseudomonas* spp. from chinese wheat fields. **Biological Control**, v. 101, n. 12, p. 1481–1491, 2011.

ZELEZNIAK, A.; SHERIDAN, S.; PATIL, K.R. Contribution of network connectivity in determining the relationship between gene expression and metabolite concentration changes. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2014.

ZHANG, Y. et al. F-Box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in arabidopsis. **Plant physiology**, Rockville, v. 148, p. 2121–2133, 2008.

ZHOU, L. et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 32, n. 50, p. 1–12, 2016.

ZHOU, Q. et al. Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA/qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring pME6032Phz using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1761–1773, 2010.