

TATIANI JANEGITZ

**EFEITOS DE *cis*-JASMONE NA INDUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
EM GENÓTIPOS DE SOJA, INOCULADOS OU NÃO COM *Meloidogyne*  
*javanica***

Maringá  
Paraná – Brasil  
Fevereiro, 2012

TATIANI JANEGITZ

**EFEITOS DE *cis*-JASMONE NA INDUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
EM GENÓTIPOS DE SOJA, INOCULADOS OU NÃO COM *Meloidogyne  
javanica***

Orientador: Osvaldo Ferrarese Filho  
Coorientadora: Clara Beatriz Hoffmann Campo

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Maringá  
Paraná – Brasil  
Fevereiro, 2012

TATIANI JANEGITZ

**EFEITOS DE *cis*-JASMONE NA INDUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
EM GENÓTIPOS DE SOJA, INOCULADOS OU NÃO COM *Meloidogyne*  
*javanica***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

.....  
16 de fevereiro de 2012.

---

Dr<sup>a</sup>. **Clara Beatriz Hoffmann Campo** (Embrapa Soja)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Kátia Regina Freitas Schwan Estrada** (UEM)

---

Prof. Dr. **Oswaldo Ferrarese Filho** (UEM)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. OSVALDO FERRARESE FILHO, pela orientação e pela confiança que depositou em meu trabalho, estando sempre disponível a me ajudar.

À Dr<sup>a</sup>. CLARA BEATRIZ HOFFMANN CAMPO, da Embrapa Soja, pela imensa contribuição científica, pelo estímulo, pela amizade, pela confiança depositada em mim durante esses quatro anos e pela agradável convivência que nunca irei esquecer.

À Dr<sup>a</sup>. MARIA CRISTINA, da Embrapa Soja, pela realização das análises estatísticas e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos grandes amigos, JOSÉ PEREZ, SIMONE VIEIRA, TATIANA UEDA, MARIANA CLOSS e THAIS LEMES, pela grande contribuição e ajuda nos experimentos. Muito obrigada pela amizade de todos, companheirismo e apoio.

À MONICA CILIATO, amiga querida, que sempre está ao meu lado em todas as situações e grande companheira em minha estadia em Maringá.

A pós-graduanda LIZANDRA CATELLI, pela amizade e disposição em sempre ajudar.

Aos funcionários do LABORATÓRIO DE NEMATOLOGIA da Embrapa Soja, pela contribuição com os experimentos.

Aos estagiários e funcionários dos laboratórios de BIOQUÍMICA VEGETAL (UEM) e de ECOLOGIA QUÍMICA (Embrapa Soja), que contribuíram para o meu trabalho.

À UEM e ao PGA (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) pela oportunidade concedida.

À EMBRAPA SOJA, por ter disponibilizado toda estrutura para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos PROFESSORES do curso que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

À minha FAMÍLIA, por todo o apoio.

Por fim, agradeço a TODOS que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

TATIANI JANEGITZ, filha de Osmar Janegitz e Vanda Calderon Janegitz, nasceu em Londrina, no Estado do Paraná, no dia 29 de março de 1986.

Em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Ciências Biológicas na UniFil (Universidade Filadélfia) em Londrina. No ano seguinte, começou a desenvolver atividades como estagiária no Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná). No ano seguinte, em 2008, a fim de expandir seus conhecimentos, deixou o IAPAR e começou a desenvolver projetos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), nos laboratórios de Fitopatologia e de Ecologia Química, onde permaneceu até fevereiro de 2010, quando se graduou como Bióloga.

## ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Cultura da soja .....	5
2.2. Fitonematoides: <i>Meloidogyne javanica</i> .....	6
2.3. Indução de resistência da soja à nematoides.....	8
2.3.1. Biossíntese de isoflavonoides.....	9
2.3.2. Jasmonatos como indutores de defesa .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1. Material biológico e delineamento experimental.....	13
3.2. Preparo do inóculo e inoculação .....	14
3.3. Efeito de <i>cis</i> -jasmone na indução de resistência.....	15
3.3.1. Pulverização foliar com <i>cis</i> -jasmone.....	15
3.3.2. Molhamento do solo com <i>cis</i> -jasmone.....	16
3.3.3. Atividade da fenilalanina amônia-liase.....	16
3.3.4. Identificação e quantificação de isoflavonoides .....	17
3.4. Fator de reprodução do nematoide .....	18
3.5. Análises estatísticas .....	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Efeito da pulverização foliar de <i>cis</i> -jasmone na indução de resistência .....	20
4.2. Efeito do molhamento de solo com <i>cis</i> -jasmone na indução de resistência .....	31
4.3. Efeito do <i>cis</i> -jasmone no fator de reprodução do nematoide .....	42
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1. Efeito da pulverização foliar com <i>cis</i> -jasmone na indução de resistência .....	45

5.2. Efeito do molhamento do solo com <i>cis</i> -jasmone na indução de resistência .....	48
5.3. Efeito do <i>cis</i> -jasmone no fator de reprodução do nematoide .....	49
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. APÊNDICE.....	60



## RESUMO

JANEGITZ, Tatiani. Universidade Estadual de Maringá. Fevereiro de 2012. **Efeitos de *cis*-jasmone na indução de compostos fenólicos em genótipos de soja, inoculados ou não com *Meloidogyne javanica*.** Professor orientador: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Conselheira: PhD Clara Beatriz Hoffmann Campo.

A indução de compostos de defesa pela aplicação de *cis*-jasmone e danos *Meloidogyne javanica* em genótipos de soja resistente e suscetível a nematoides de galha foi analisada. Plântulas de BRS 133 (suscetível) e PI 595099 (resistente) foram tratadas com pulverização foliar ou molhamento do solo e inoculadas com o nematoide. Extratos de raízes foram analisados em cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) para identificação de compostos fenólicos e atividade da PAL. A reprodução do nematoide foi determinada pelo Fator de Reprodução (FR). A pulverização foliar com *cis*-jasmone induziu sistemicamente a atividade da PAL, após 120h da aplicação, e a síntese de daidzeína, genisteína e coumestrol, após 144h, nas raízes das plantas, sendo essa indução maior no genótipo resistente. Pulverização foliar com *cis*-jasmone e inoculação aumentaram a atividade da PAL, 72h após a inoculação, e induziram a fitoalexina coumestrol, após 144h. Em plantas tratadas com molhamento do solo, a atividade da PAL e as concentrações de isoflavonoides foram maiores no controle e no genótipo suscetível, mas, quando tratado com molhamento do solo e inoculação, foram maiores no genótipo resistente. Estes resultados sugerem que a indução de forma sistêmica da fitoalexina coumestrol, nas raízes de soja, por *cis*-jasmone assim como em resposta a nematoides parasitas, podem estar relacionados à resistência da soja à *M. javanica*.

**Palavras-chave:** Indução de resistência; jasmonatos; fenilalanina amônia-liase; coumestrol; nematoides de galha.

## ABSTRACT

JANEGITZ, Tatiani. Universidade Estadual de Maringá. February 2012. **Effects of *cis*-jasmonone in the induction of phenolic compounds in soybean genotypes with inoculated or without *Meloidogyne javanica***. Adviser: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Member: PhD Clara Beatriz Hoffmann Campo.

The induction of defense compounds by *cis*-jasmonone and damage *Meloidogyne javanica* in soybean genotypes resistant and susceptible to root-knot nematodes was analyzed. Seedlings of BRS 133 (susceptible) and PI 595099 (resistant) were treated with foliar spraying or soil drench and inoculated with the nematode. Root extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to phenolic compounds identification and PAL activity. Reproduction of nematode was determined by the reproduction factor (FR). The foliar spraying with *cis*-jasmonone systemically induced PAL activity after 120h of application, and the synthesis of daidzein, genistein and coumestrol were observed after 144h; and this induction was higher in the resistant genotype. Effects of foliar spraying with *cis*-jasmonone plus inoculation were observed by increasing the PAL activity after 72h inoculation and induce phytoalexin coumestrol after 144h. In plants treated with soil drench, the PAL activity and of isoflavone concentrations were higher in the control and susceptible genotype, but when treated with soil drench plus inoculation, were higher in the resistant genotype. These results suggest that induction of systemic form of phytoalexin coumestrol, in the roots of soybeans, for *cis*-jasmonone well as in response to nematodes parasites may be related to soybean resistance to *M. javanica*.

**Keywords:** Resistance induction; jasmonatos; phenylalanine ammonia-liase; coumestrol; root-knot nematodes.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das culturas de maior importância econômica para o Brasil, com uma produção estimada de 68,55 milhões de toneladas na safra 2010/11 (CONAB, 2011). Entre os principais fatores que contribuem para queda de rendimento da soja, destacam-se os nematoides parasitas de plantas, contribuindo com perdas de 11% da produção anual da cultura (BARKER, 1998, REGNAULT-ROGER et al., 2002). No Brasil, espécies do gênero *Meloidogyne* estão amplamente distribuídas, sendo *M. javanica* a espécie que vem causando danos crescentes a essa cultura por apresentar maior dificuldade de controle (TECNOLOGIAS..., 2011).

A utilização de cultivares resistentes ou tolerantes é a principal forma de controle dos nematoides e a mais aceitável pelos agricultores, já que o desempenho dos nematicidas tem sido pouco eficiente e altamente tóxico ao meio ambiente (MARTIN, 2003, AUBERTOT et al., 2006). Outras formas de controle de plantas contra nematoides se fazem necessárias e a indução de resistência é uma nova ferramenta que pode possibilitar a redução das populações de nematoides e propiciar a identificação de genes candidatos à utilização em programas de melhoramento.

A indução de resistência consiste no aumento dos níveis de resistência da planta pela ativação de genes que codificam para diversos compostos de defesa em resposta a fatores externos bióticos e/ou abióticos (CAVALCANTI et al., 2005). Essas respostas de defesa estão relacionadas com a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL - EC 4.3.1.5), conduzindo para acúmulo de lignina e a síntese de isoflavonas e fitoalexinas (KOVÁCIK et al., 2007).

A isoflavona daidzeína é precursora das fitoalexinas gliceolinas (GRAHAM, 1991), e, segundo estudos, suas concentrações são aumentadas em cultivares de soja resistentes a *M. incognita*, após dez dias da inoculação com juvenis (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2005), sendo, assim, considerada um composto induzível na resposta de defesa a nematoides.

As defesas das plantas elicitadas como resposta ao ataque de pragas e patógenos, conhecidas como resistência induzida e resistência sistêmica

adquirida, estão associadas a distintos conjuntos de genes de defesa mediados por jasmonatos e salicilatos, respectivamente (RAYAPURAM & BALDWIN, 2007; KESSLER & BALDWIN, 2002).

É amplamente aceito que o ácido jasmônico e metil jasmonato são ativadores de defesa de plantas (KESSLER & BALDWIN, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos, em soja, do *cis*-jasmone, que é o produto final da via biossintética do ácido jasmônico. O *cis*-jasmone é altamente ativo na interação planta-inseto causando um aumento significativo na produção de (E)-ocimene em plantas de feijão (BIRKET et al., 2000). Esse composto também tem efeitos na indução de metabolitos secundários responsáveis pela defesa de plantas de trigo contra pragas (MORAES et al., 2008). Entretanto, não existem relatos do efeito de *cis*-jasmone na indução de resistência de plantas de soja a nematoides.

Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e quantificar os compostos fenólicos induzidos por *cis*-jasmone, de forma sistêmica e localizada, em raízes de soja, infectados ou não com *M. javanica*, além de avaliar os efeitos do *cis*-jasmone no fator de reprodução do nematoide em genótipos resistentes e suscetíveis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cultura da soja

A soja, além de ser utilizada como alimento para atender os mercados interno e externo, tanto em estado natural como por meio dos seus produtos processados (óleo e farelo), é também a principal fonte de óleo para a crescente produção nacional de biodiesel (EMBRAPA, 2010). A soja é cultivada há mais de 5.000 anos na China, seu país de origem, sendo um dos principais alimentos em países orientais (XU et al., 1989). Essa leguminosa chegou ao Brasil em 1882, no estado da Bahia, mas apenas com objetivos acadêmicos. Comercialmente, a cultura foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, em 1914, como alternativa para o verão, em sequência ao cultivo do trigo, plantado no inverno, que era a principal cultura dos estados do sul do Brasil (OJIMA & YAMAKAMI, 2003).

Nos últimos 35 anos, a soja foi à cultura que mais cresceu, tanto no Brasil, quanto no mundo, sendo a principal responsável pela expansão da fronteira agrícola. Na safra 2010/11 a área plantada, no Brasil, foi de 24,08 milhões de hectares, ou seja, aproximadamente 50% da área total de plantio (CONAB, 2011). Como apenas 5,8% da área agropecuária brasileira são cultivadas com a oleaginosa, o Brasil é o único produtor mundial com potencial para expandir significativamente a sua área de cultivo de soja, com a perspectiva de liderar, num futuro próximo, o mercado mundial (EMBRAPA, 2010).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com produção estimada de 68,55 milhões de toneladas na safra 2010/11 (CONAB, 2011). O Estado de Mato Grosso lidera a produção nacional, sendo observado crescimento de 147,3 mil toneladas em comparação com a safra de 2009/2010, seguido do Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (CONAB, 2011). Entretanto, é necessário salientar que doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus limitam a obtenção de altos rendimentos, estimando-se perdas anuais de 15% a 20% da produção (TECNOLOGIAS..., 2011) e sendo

crecentes os danos causados por nematoides de galha, no Brasil, principalmente na região de cerrado.

## **2.2. Fitonematoides: *Meloidogyne javanica***

Mais de 100 espécies de nematoides, envolvendo cerca de 50 gêneros, foram associadas a cultivos de soja em todo o mundo. Entretanto, no Brasil, os nematoides mais prejudiciais à cultura da soja têm sido os formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.), o de cisto (*Heterodera glycines*), o das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (TECNOLOGIA..., 2011).

As espécies formadoras de galhas, *M. javanica* e *M. incognita*, são as mais frequentes, correspondendo a 86% das espécies encontradas em áreas tropicais e subtropicais (TAYLOR et al., 1982). *M. javanica* tem sido a espécie responsável por prejuízos crescentes à cultura da soja (KIMATI et al., 2005). Essa espécie tem sido constatada no norte do Rio Grande do Sul, sudoeste e norte do Paraná, sul e norte de São Paulo, e sul do Triângulo Mineiro. Na região central do Brasil, o problema é crescente, com severos danos em lavouras do Mato Grosso do Sul e Goiás (TECNOLOGIAS..., 2005).

O ciclo de vida de *M. javanica*, que, dependendo das condições ambientais, se completa em um mês, consiste em seis estádios fenológicos: ovo, quatro larvais (juvenis - J) e adulto (WILLIAMSON & GLEASON, 2003). Segundo esses autores, temperaturas ótimas para as atividades vitais dos nematoides variam entre 25°C a 30°C; acima de 40°C ou abaixo de 5°C estas atividades são reduzidas.

Dentro do ovo, ocorre a primeira ecdise, formando o juvenil de segundo estágio (J2), que é a forma infectante para a planta. Após eclosão, o J2 se movimenta pelo solo até penetrar na ponta da raiz estabelecendo o parasitismo (AGRIOS, 1997). O nematoide migra na raiz e, através do estilete, perfura a célula, liberando secreções enzimáticas provindas das glândulas esofagianas (CAILLAUD et al., 2008). Segundo esses autores, essas secreções incitam a hipertrofia celular do cilindro central e hiperplasia no periciclo, dando origem às

chamadas células gigantes, cujo conteúdo serve de nutriente para o nematoíde.

Dentro da raiz, os nematoides J3 e J4 se alimentam até a fase adulta. Quando encontra condições desfavoráveis ao parasitismo, o J4 se torna adulto macho (vermiforme), que sai do hospedeiro, mas quando as condições são favoráveis, J4 se transforma em adulto fêmea (piriforme), liberando em torno de 500 ovos, que podem ficar aglomerados em massas junto ao corpo das fêmeas, interna ou externamente às raízes (WILLIAMSON & GLEASON, 2003). A reprodução se dá por partenogênese, não necessitando do macho para a formação de ovos (KIMATI et al., 2005).

Nas áreas onde há presença dos nematoides de galha, observam-se manchas em reboleiras nas lavouras, devido à baixa mobilidade destes organismos no solo (TECNOLOGIAS..., 2011). As folhas das plantas afetadas normalmente apresentam manchas cloróticas ou necrose entre as nervuras e porte reduzido. Esses sintomas foliares podem não ocorrer, mas o amadurecimento precoce e abortamento das vagens são visíveis. Nas raízes podem-se observar engrossamentos na região em que o parasitismo ocorre, podendo atingir o dobro de diâmetro. Essas raízes diferenciadas, facilmente visíveis a olho nu, constituem as chamadas galhas, que, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional do nematoíde no solo, apresentam número e tamanhos variados. No interior das galhas, estão localizadas as fêmeas do nematoíde de coloração branco-pérola (FERRAZ, 2001).

As células gigantes e as galhas são respostas distintas à injeção de secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematoíde em células das raízes das plantas hospedeiras, sendo as primeiras essenciais ao desenvolvimento e à reprodução do parasito. Enquanto as galhas, apesar de serem bons indicadores da extensão das reações hiperplásica e hipertrófica dos tecidos afetados pelas secreções, podendo ser formadas antes que as células gigantes ou na ausência destas, não são essenciais ao desenvolvimento do nematoíde (DAVIS et al., 2004).

Os sintomas e danos dos nematoides formadores de galha são mais severos quando acompanhados por compactação do solo, excesso ou falta de

calagem e estresse hídrico, porém os anos muito chuvosos favorecem sua disseminação (KIMATI et al., 2005). Os fitonematoides não podem ser erradicados em razão de seu vasto círculo de hospedeiros (FERRAZ, 2001). Assim, várias medidas de controle devem ser utilizadas de modo integrado, visando manter as populações em baixos níveis. Além do plantio direto, a rotação/sucessão de culturas com hospedeiros resistentes (crotalaria, amendoim, algodão e sorgo) minimiza a população do nematoide, recuperando a atividade microbiana do solo e possibilitando o crescimento de inimigos naturais (TECNOLOGIA..., 2011).

A utilização de cultivares resistentes ou tolerantes, além de ser uma ferramenta muito importante para o controle de fitonematoides, é o método mais aceitável pelos agricultores, já que o efeito dos nematicidas é muito variável, pouco eficiente e altamente tóxico a outros organismos e ao meio ambiente (FERRAZ, 2001). Assim, há uma grande necessidade de se obter medidas para o controle de fitonematoides ambientalmente aceitáveis. E a indução de resistência, que envolve a ativação de mecanismos de defesa das plantas em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos, pode ser uma nova ferramenta para a redução das populações da praga no campo, além de possibilitar a identificação de genes candidatos à utilização em programas de melhoramento.

### **2.3. Indução de resistência da soja a nematoides**

No início da interação nematoide-planta, os exsudados radiculares influenciam diretamente na atração do patógeno em direção à planta hospedeira (SALGADO & SILVA, 2005). A resposta de resistência da planta aos nematoides pode ocorrer pela rápida necrose local no sítio de infecção (reação de hipersensibilidade), pela deposição de lignina, acúmulo de peroxidases, superóxido dismutase, quitinases e inibidores de proteinases, além da ativação de rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de fitoalexinas (GHEYSEN & FENOLL, 2002).

As respostas de defesa iniciam-se pelo reconhecimento da molécula elicitadora por proteínas receptoras ancoradas à membrana plasmática da célula



vegetal, o que induz inicialmente à explosão oxidativa, caracterizada pela rápida geração e acúmulo de espécies ativas de oxigênio que disparam a peroxidação dos lipídios na membrana e indução de outras respostas de defesa das células (BOWLES et al., 1991). A peroxidação de lipídios ativa a cascata de sinalização do ácido jasmônico (JA), levando à síntese de certas proteínas de defesa e outros compostos de defesa da via dos fenilpropanoides (ATKINSON, 1995).

### **2.3.1. Biossíntese de isoflavonoides**

A via dos fenilpropanoides (Figura 1) é multiramificada, conduzindo para a síntese de lignina, antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides e fitoalexinas (KOVÁCIK et al., 2007). Esta via inicia-se por meio da reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL - EC 4.3.1.5) que elimina uma molécula de amônia da fenilalanina para formar o ácido *trans*-cinâmico e, a partir desse, a ativação de outras enzimas, como a chalcona sintase (CHS) e isoflavona sintase (IFS), e a síntese de compostos fenólicos mais complexos (YU e MCGONIGLE, 2005). Níveis de atividade da PAL podem diferir amplamente de acordo com o genótipo, a fase de desenvolvimento da planta e estímulos ambientais (DIXON & PAIVA, 1995).

Na presença de microrganismos patogênicos, a planta desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando sua quantidade e estimulando a síntese de compostos fenólicos (SHORESH et al., 2005). Em cultivar de soja resistente aos nematoides, a atividade da PAL aumenta e sua transcrição conduz para o aumento da síntese das fitoalexinas gliceolinas em resposta à infecção pelo nematoide (EDENS, et al., 1995).

Os isoflavonoides fitoalexinas possuem uma vasta extensão de propriedades biológicas, mas as mais importantes são atividades estrogênicas, antifúngicas e bactericidas (WILLIAMS & HARBORNE, 1989), sendo as gliceolinas (pterocarpanos) e o coumestrol (coumestrans), além de outros isoflavonoides como a genisteína, daidzeína e gliciteína e seus glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), os mais frequentemente relacionados à proteção em soja (DEWICK, 1994). Tanto daidzina como genistina aumentaram

a sua concentração em sementes de soja submetidas ao ataque de percevejos fitófagos (PIUBELLI et al., 2003), sendo os dois isoflavonoides os compostos mais relacionados à defesa da soja aos estresses biológicos (GRAHAM & GRAHAM, 1991). Genisteína se encontra predominantemente nas folhas de soja (GRAHAM, 1991), onde ela e seus conjugados, segundo Graham & Graham (1999), desempenham múltiplos papéis na defesa da planta, sendo inclusive diretamente tóxica para alguns patógenos.

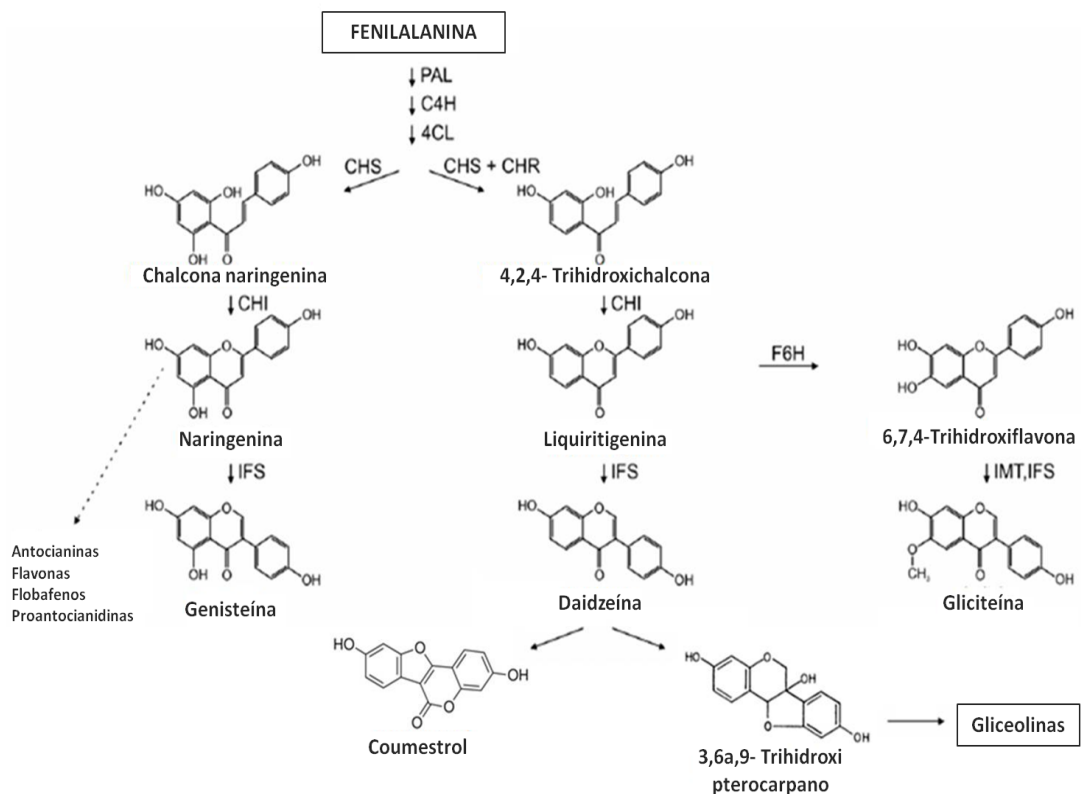


Figura 1. Via dos fenilpropanoides em soja. Fenilalanina amônia-liase (PAL), chalcona sintase (ChS) e isoflavona sintase (IFS) são as principais enzimas da via para formação dos isoflavonoides. A daidzeína é precursora das fitoalexinas gliceolinas e coumestrol (modificado de DHAUBHADEL et al., 2003).

Além de ser precursora das gliceolinas, daidzeína e seus conjugados são encontrados predominantemente nas raízes de soja (GRAHAM, 1991). Carpentieri-Pípolo et al. (2005) observaram que concentração de daidzeína aumentou em cultivar resistente aos nematoides, dez dias após inoculação com *M. incognita*, sendo esta isoflavona induzível em resposta de defesa aos nematoides.

Na soja, tem sido relatada a ocorrência de gliceolinas induzíveis em folhas após o ataque de lagartas desfolhadoras (LUI et al., 1992) e de patógenos como *Phytophthora sojae* (ABBASI et al., 2001), por exemplo. Além disso, os compostos produzidos via fenilpropanoides também são induzidos por jasmonatos (GRAHAM & GRAHAM, 1996), podendo estar envolvidos na resistência da soja a pragas e patógenos.

### **2.3.2. Jasmonatos como indutores de defesas**

As defesas das plantas elicitadas como resposta ao ataque de pragas e patógenos conhecidas como resistência induzida e resistência sistêmica adquirida (RSA) estão associadas a distintos conjuntos de genes de defesa (RAYAPURAM & BALDWIN, 2007). Esses genes são mediados por fitohormônios como os jasmonatos (ácido jasmônico e seus derivados) e os salicilatos (ácido salicílico e seus derivados) (KESSLER & BALDWIN, 2002). Esses compostos fazem parte do metabolismo de plantas, mas podem ser aplicados de forma exógena, possibilitando uma gama enorme de bioensaios elucidativos das respostas de plantas aos estresses.

A biossíntese dos jasmonatos inicia-se pela ativação da lipoxigenase, que converte ácido linolênico para formação de ácido jasmônico (JA), que, por sua vez, pode ser convertido em vários derivados, incluindo metil jasmonato (MeJA) e *cis*-jasmone (WESTERNACK, 2007).

O JA e MeJA são importantes reguladores hormonais em várias etapas do desenvolvimento das plantas (KORTH & THOMPSON, 2006) sendo reconhecidos como ativadores da defesa das plantas (KOCH et al., 1999; KESSLER & BALWIN, 2002). Em plantas de aveia tratadas com MeJA, observou-se a indução de flavonoide responsável pela resistência a nematoides (SORIANO et al., 2004b).

Em soja, JA é apontado como potencializador do acúmulo da isoflavona genistina (GRAHAM & GRAHAM, 1996). Segundo Graham & Graham (1999), esse composto e seus conjugados desempenham múltiplos papéis na defesa da soja, sendo inclusive diretamente tóxicos para alguns patógenos, como *Phytophthora sojae*. Entretanto, poucos estudos têm sido

conduzidos para avaliar o impacto de *cis*-jasmone (cJ), que é considerado o produto final da biossíntese do ácido jasmônico (KOCH et al. 1997). Esse composto é mais volátil quando comparado com outros provindos do JA, mas também tem sido considerado um ativador de defesa química em plantas, apresentando ainda efeito persistente e altamente específico na regulação da expressão de genes associados com a defesa das plantas (PICKETT & POPPY, 2001). O cJ é altamente ativo na interação planta-inseto, causando aumento significativo na produção de (E)-ocimene em plantas de feijão (BIRKET et al., 2000). Esse composto também tem efeitos na indução de metabólitos secundários responsáveis pela defesa de plantas de trigo contra pragas (MORAES et al., 2008). Entretanto, não existem relatos do efeito de cJ na indução de resistência de plantas de soja contra nematoides.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico e delineamento experimental

Para a realização dos experimentos, os genótipos de soja BRS 133 (suscetível a *M. javanica*) e PI 595099 (resistente a *M. javanica*) foram semeados em tubetes plásticos (4,5 cm de diâmetro e 19 cm de comprimento), contendo areia esterilizada como substrato em casa de vegetação (Figura 2), sob condições de temperatura (25°C a 30°C) controladas, e fotoperíodo de 12h. As sementes de soja foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Soja (Embrapa Soja), localizado em Londrina-PR.

Para as análises bioquímicas, foram conduzidos quatro experimentos independentes em casa de vegetação, com o delineamento experimental de blocos ao acaso (DBC), com os tratamentos organizados em arranjo fatorial 2 x 2 x 6: dois genótipos de soja (PI595099 e a BRS 133), dois níveis de tratamentos (*cis*-jasmone e controle [Água + Twenn 20]), seis horas de avaliação (0, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) e quatro blocos (cada repetição com 2 replicatas), totalizando 192 parcelas experimentais para cada experimento.

No primeiro experimento, foi realizada pulverização de *cis*-jasmone (cJ) somente na área foliar. No segundo experimento, foi realizada a pulverização de cJ na área foliar e inoculação de nematoides na raiz. No terceiro experimento, realizou-se a aplicação de cJ, molhando o solo. No quarto experimento, realizou-se molhamento do solo com cJ e inoculação de nematoides na raiz. Nas plantas, a aplicação de água com 0,02% de Tween 20 (Uniquema) foi utilizada como solução controle para os quatro experimentos. Para evitar o contato, as plantas tratadas com cJ foram espacialmente separadas das plantas controle, devido à volatilidade do cJ.

Para análise biológica, foram realizados dois experimentos em casa de vegetação para avaliar o efeito dos tratamentos no fator de reprodução (FR) do nematoide em plantas inoculadas após 50 dias com a pressão populacional da praga. O delineamento experimental foi também o de blocos ao acaso com os

tratamentos em arranjo fatorial: 2 x 2: dois genótipos de soja (PI 595099 e BRS 133), dois tratamentos (*cis*-jasmone e controle) e quatro blocos, totalizando 16 parcelas experimentais.



Figura 2. Foto ilustrativa da montagem dos experimentos em casa de vegetação. Plântulas de soja sendo desenvolvidas em tubetes plásticos contendo areia esterilizada como substrato.

### 3.2. Preparo do inóculo e inoculação

A população de *M. javanica* foi multiplicada em soja, cultivar Embrapa 20 (Doko RC), mantida em vasos em casa de vegetação, durante todos os períodos de inoculação, para obter ovos com boa viabilidade. Para extração dos ovos de nematoides, raízes com galhas foram coletadas, lavadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5%, segundo protocolo adaptado de Hussey & Barker (1973). Em seguida, o extrato foi passado em uma peneira de malha 200 mesh sobre outra peneira de malha 500 mesh, e a suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão, mantidas a 26°C. A extração de juvenis de segundo estágio (J2) foi realizada durante cinco dias e armazenada em geladeira. Para a preparação do inóculo, os J2 foram quantificados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio óptico.

Para inoculação das plantas com os nematoides, foi feito um orifício de 2 cm com um bastão de vidro, no substrato, próximo à radícula das plântulas. Com uma pipeta automática, 1000 J2/planta, foram injetados neste orifício (Figura 3).



Figura 3. Foto ilustrativa da inoculação de plântulas de soja com juvenis segundo estágio (J2) de *M. javanica*.

### **3.3. Efeito de *cis*-jasmone na indução de resistência**

#### **3.3.1. Pulverização foliar com *cis*-jasmone**

Após sete dias da sementeira, plântulas individuais contendo a primeira folha unifoliada foram pulverizadas com aproximadamente 1mL de 1,4mM de *cis*-jasmone (*Sigma Chemical Co* - Missouri, USA) solubilizado com 0,02% de Tween 20 e as plântulas controle foram pulverizadas com solução de água destilada contendo 0,02% de Tween 20. A concentração de cJ utilizada nos experimentos foi conforme descrito por Moraes et al. (2008).

No primeiro experimento, em 0h (antes da pulverização foliar), 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após a pulverização foliar com cJ ou controle, amostras de raízes foram coletadas para posterior análise da atividade da PAL e quantificação de isoflavonoides. No segundo experimento, após 48h da pulverização foliar, as plântulas foram inoculadas conforme descrito no item

4.2., e as raízes foram coletadas em 0h (antes da inoculação), 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após inoculação, para posterior análise.

### **3.3.2. Molhamento do solo com *cis*-jasmone**

Após sete dias da semeadura, plântulas individuais foram tratadas, molhando-se o solo com 30mL de 1,4mM de cJ diluído em 0,02% de Tween 20, e as plântulas controle foram tratadas com molhamento de solo com água destilada contendo 0,02% de Tween 20.

No terceiro experimento, em 0h (antes do molhamento do solo), 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após molhamento do solo com cJ ou controle, amostras de raízes foram coletadas para posterior análise da atividade da PAL e quantificação de isoflavonoides. No quarto experimento, após 48h do molhamento do solo, as plântulas foram inoculadas com nematoides, conforme descrito no item 4.2., e as raízes foram coletadas em 0h (antes da inoculação), 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após inoculação, para posterior análise.

### **3.3.3. Atividade da fenilalanina amônia-liase**

A extração da PAL foi fundamentada na metodologia descrita por Ferrarese et al. (2000) com o seguinte procedimento: raízes frescas foram maceradas em tampão borato 0,2 M pH 8,8, ajustando o volume de 2,5mL/g de raiz. Após maceração, as amostras foram centrifugadas (12000g, 15 minutos, 4°C), e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática e determinação de proteínas.

Um volume de 250µL do extrato enzimático foi incubado a 40°C com 1mL de tampão borato 0,1M pH 8,7 e 300µL de L-fenilalanina 50mM por 1 hora. A reação foi interrompida com 50µL de HCl 5,0M. A solução foi filtrada, utilizando-se filtro de 0,45µm (Acrodisc®) e injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu®, Japão), equipado com detector de fotodiodo SPD-M20A. As análises foram realizadas em coluna (C18, 150mm x 4,6mm) em gradiente isocrático com fase móvel composta de metanol (MeOH): água (70%:30%) com fluxo de 0,5mL min<sup>-1</sup> durante 10 min., e a absorvância pelo



detector UV foi medida em 275nm. O produto da reação, *trans*-cinamato, foi detectado e identificado por comparação com padrão de ácido cinâmico do Sigma Chemical Co (Missouri, USA). A atividade da PAL foi expressa em nmols de *trans*-cinamato formado por hora.

Para a obtenção dos valores da atividade específica da PAL, as proteínas totais dos extratos foram determinadas pelo método de Bradford (1976). A albumina bovina (BSA) foi utilizada como padrão, nas concentrações de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com as leituras realizadas em duplicatas em espectrofotômetro a 595 nm.

A atividade específica da PAL em  $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína de cada amostra de raiz foi calculada pela divisão da quantidade de *trans*-cinamato  $\text{h}^{-1}$  e a concentração de proteína em mg de raízes (peso).

#### **3.3.4. Identificação e quantificação de Isoflavonoides**

Para a análise de isoflavonoides, as raízes foram coletadas e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido. O tecido coletado foi moído em almofariz de porcelana, pesado em balança analítica e extraído com 3mL de 90% MeOH aquoso por 20 min em ultrassom. A suspensão foi evaporada sob fluxo de  $\text{N}_2$ , e as amostras foram ressolubilizadas com 1mL de 80% MeOH. A seguir, as amostras foram filtradas através de filtro-seringa "Acrodiscs" e transferidas para tubos amostrador (*vials*) do autoinjeter. Uma alíquota de 10 $\mu\text{L}$  foi injetada automaticamente no HPLC. As análises foram realizadas em coluna analítica ( $\text{C}_{18}$ , fase reversa, 250 X 4,6 id), em gradiente linear com fases móveis compostas de (i) 2% de ácido acético (HOAc) e (ii) MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O, 18:1:1. Durante as análises, a absorvância foi medida pelo detector UV em 260nm, para identificação dos flavonoides e 280nm para gliceolinas. O tempo de retenção (*R<sub>f</sub>*) na coluna e o espectro dos compostos observados nas amostras foram comparados com aqueles obtidos para os padrões.

Para obtenção das áreas dos compostos, diferentes concentrações dos padrões de isoflavonas conjugadas de genistina, daidzina e glicitina (glicosil, malonil e acetil), além das agliconas, ácido salicílico e coumestrol foram

injetadas no HPLC. Com os valores das áreas dos compostos padrão e de suas concentrações foi construído um gráfico de dispersão e obtida uma equação de regressão linear e o seu respectivo fator de correção. A concentração dos compostos em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de raiz de cada genótipo foi calculada pela divisão da concentração obtida da curva ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pela massa de tecido de cada genótipo, considerando o volume de ressolubilização e convertido para  $\text{ng mg}^{-1}$ .

### **3.4. Fator de reprodução do nematoide**

Os dois genótipos foram semeados em tubetes contendo uma mistura solo:areia (3:1) esterilizado como substrato. Sete dias após semeadura, as plantas individuais foram tratadas com pulverização foliar ou molhamento do solo com 1,4mM de *cis*-jasmone como descrito acima. Plântulas controle foram tratadas com água destilada contendo 0,02% de Tween 20. Após 48h do tratamento, as plântulas foram inoculadas com 1000 J2, com pipeta automática, em orifício aberto no substrato, próximo à radícula (conforme Figura 3). Após 50 dias da inoculação, tempo necessário para que o ciclo de vida das fêmeas do nematoide se complete, as raízes das plantas foram coletadas, lavadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio 0,2%, seguindo protocolo adaptado de Hussey & Barker (1973). Em seguida, o extrato foi passado em peneira de malha 200 mesh sobre outra peneira de malha 500 mesh, e a suspensão diluída em 400 mL de água para contagem dos indivíduos em câmara de Peters, com microscópio óptico. Para obtenção do fator de reprodução do nematoide, a quantidade dos indivíduos por planta foi dividida pela quantidade de J2 inoculados.

### **3.5. Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise exploratória para a verificação da existência de todos os pressupostos exigidos para a análise de variância (ANOVA). Em seguida, realizaram-se comparações múltiplas das médias pelo teste Tukey pelo menos a 5% de probabilidade. Dados quantitativos foram

submetidos à análise de regressão. Os programas estatísticos utilizados foram os pacotes SAS-Statistical Analysis System, versão 9.2 (2001) e Sanest para DOS (ZONTA et al., 1982). Para o cálculo das esperanças do Quadrado Médio, os efeitos do modelo foram considerados como fixos, com exceção do efeito do bloco, que foi aleatório.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito da pulverização foliar de *cis*-jasmone na indução de resistência

#### Plantas sem inoculação

Nas análises de raízes de plantas de soja tratadas com pulverização foliar, foram determinadas a atividade da enzima PAL e identificação dos compostos constitutivos e induzidos. Nesse experimento, observou-se a produção dos isoflavonoides daidzeína e genisteína, além da fitoalexina coumestrol. Pela análise de variância (Quadro 1), observou-se efeito significativo de genótipo, hora e tratamento no aumento das concentrações de todos os compostos observados, exceto de genótipo para coumestrol.

O efeito da interação entre hora x tratamento foi significativo na atividade da PAL e no aumento das concentrações de todos os compostos, enquanto as demais, genótipo x hora e genótipo x tratamento, foram apenas para alguns dos compostos observados nas análises cromatográficas. Observou-se interação significativa de genótipo x hora nas concentrações de genisteína e coumestrol, e de genótipo x tratamento nas concentrações de daidzeína. A interação tripla (genótipo x hora x tratamento) não foi significativa tanto para a atividade da PAL como nas concentrações dos compostos fenólicos.

Quadro 1. Resumo da análise de variância (graus de liberdade e valor de F) para atividade da fenilalanina amônia-liase, daidzeína, genisteína e coumestrol em plantas tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone

Fontes de variação	G.L	Valor de F			
		Atividade da PAL	Daidzeína	Genisteína	Coumestrol
Genótipo	1	15.27***	45.48***	53.15***	0.44 <sup>ns</sup>
Hora	5	34.70***	22.35***	23.05***	54.90***
Tratamento	1	52.44***	14.42***	6.81*	24.62***
Gen*Hor	5	2.23 <sup>ns</sup>	1.90 <sup>ns</sup>	3.35**	14.09***
Gen*Tra	1	0.09 <sup>ns</sup>	5.43*	0.09 <sup>ns</sup>	3.03 <sup>ns</sup>
Hor*Tra	5	6.03***	2.55*	3.47**	6.36***
Gen.*Hor*Tra	5	1.54 <sup>ns</sup>	1.08 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	1.00 <sup>ns</sup>
Resíduo	69				

\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 e ns – não significativo.

As médias gerais dos genótipos obtidas em todo o período de avaliação (horas) estão apresentadas na Figura 4. Nessa figura, observa-se que plantas tratadas com cJ tiveram a atividade da PAL maior (Figura 4A) (7,01 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) quando comparado com plantas controle (4,89 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Da mesma forma, concentrações de daidzeína, genisteína e coumestrol, foram maiores em plantas tratadas com cJ (figura 4B, C, D).

A média geral de atividade da PAL (Figura 5A), quando comparada entre os genótipos, foi significativamente maior no genótipo resistente PI 595099 (6,52 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) que no suscetível BRS 133 (5,38 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). As concentrações de daidzeína e genisteína (65,1 ng mg<sup>-1</sup> e 4,34 ng mg<sup>-1</sup>, respectivamente) nas raízes de soja (Figura 5B, C) também foram maiores no genótipo resistente que no suscetível (37,2 ng mg<sup>-1</sup> e 2,31 ng mg<sup>-1</sup>), não havendo diferença significativa na concentração de coumestrol nos dois genótipos.

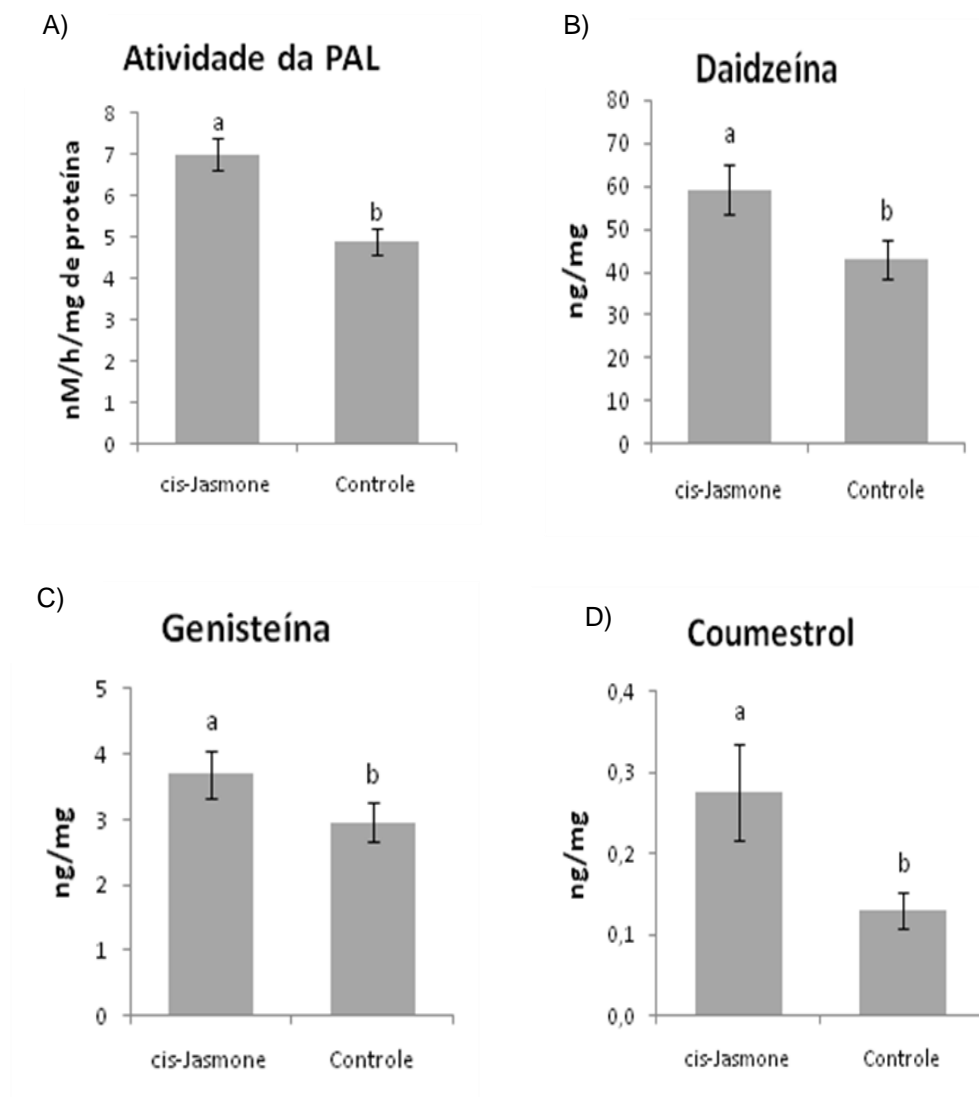


Figura 4. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzeína (B), genisteína (C) e coumestrol (D) em raízes de plantas tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone e controle. Gráficos correspondentes à daidzeína e coumestrol apresentam dados com as médias originais e significância do ajuste com transformação de  $x^{(1 - 0.84033)}$  e  $x^{(1 - 0.43084)}$ , respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

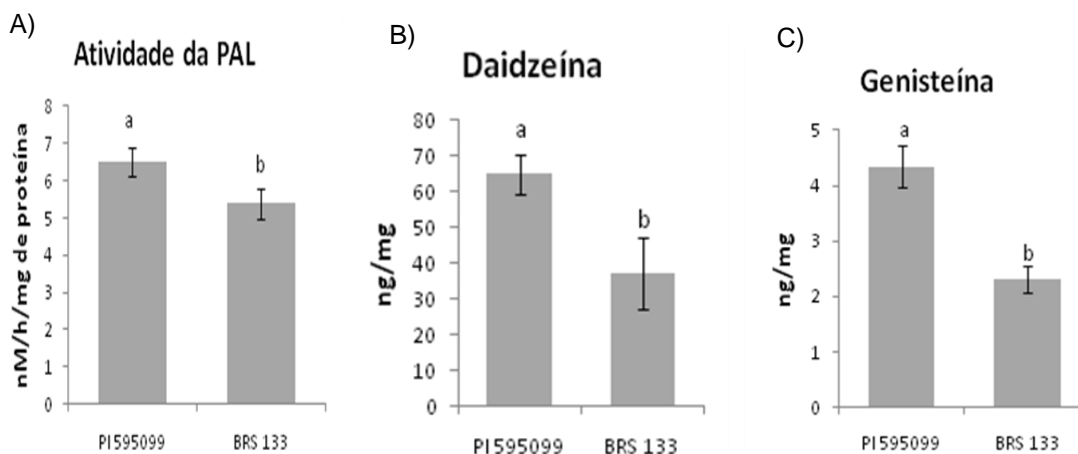


Figura 5. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzeína (B) e genisteína (C) nas raízes dos genótipos BRS 133 e PI 595099 tratados com pulverização foliar de *cis*-jasmone. Gráficos correspondentes à daidzeína e coumestrol apresentam dados com as médias originais e significância do ajuste com transformação de  $x^{(1 - 0.84033)}$  e  $x^{(1 - 0.43084)}$ , respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 6, são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação hora x tratamento. A resposta da atividade da PAL, nas raízes, à aplicação foliar de ambos os tratamentos foi quadrática. A atividade da enzima manteve-se baixa nas primeiras horas de coleta (0, 48, 72 horas após aplicação), aumentando em 96h e 120h após aplicação, para ambos os tratamentos (Figura 6A). Porém, de um modo geral, a atividade da enzima foi mais acentuada nas plantas tratadas com cJ.

Concentrações de daidzeína e genisteína aumentaram mais acentuadamente 120h e 144h após aplicação de cJ, enquanto no controle houve um aumento ao longo das horas de coleta (Figura 6B, C). O modelo ajustado para a concentração de daidzeína no tratamento controle foi linear, enquanto que nas parcelas com aplicação foliar de cJ foi quadrática. Da mesma forma, a resposta foi quadrática ou linear, no aumento da concentração de genisteína nas raízes cujas plantas foram pulverizadas com cJ ou no tratamento controle, respectivamente.

Indução de coumestrol foi observada a partir de 48h após aplicação foliar dos tratamentos (Figura 6D). Em plantas tratadas com cJ, observou-se, após 144h da aplicação, um aumento de aproximadamente cinco vezes na

concentração da fitoalexina, atingindo  $1\text{ng mg}^{-1}$ . Uma resposta quadrática foi observada nos dados das raízes cujas plantas foram tratadas com cJ ou controle.

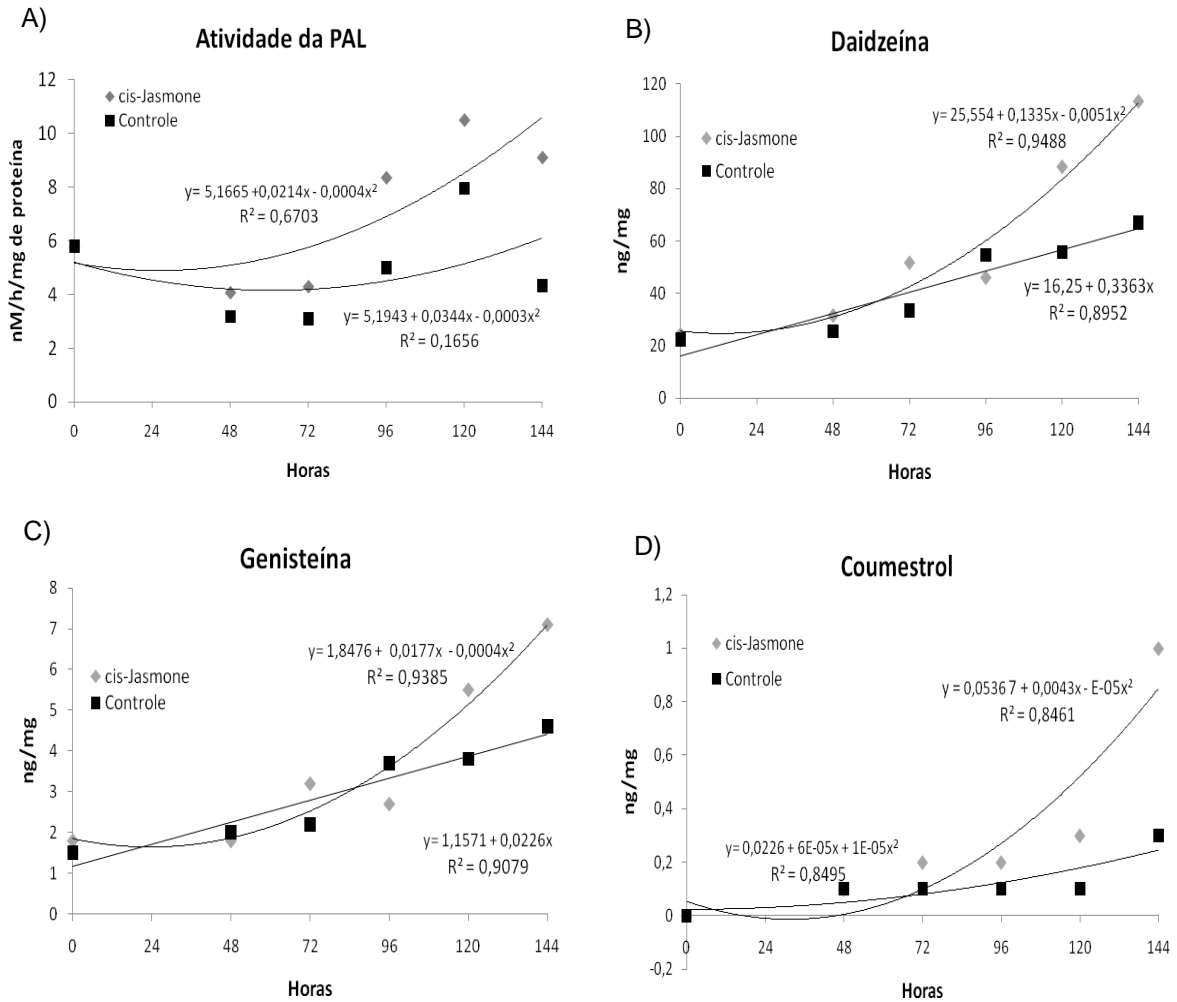


Figura 6. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzeína (B), genisteína (C) e coumestrol (D) em raízes de plantas tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone e controle. Análise de Regressão polinomial para os níveis de hora dentro de tratamento.

Na interação genótipo x hora observou-se efeitos significativos apenas nas concentrações de genisteína e coumestrol. Na Figura 7 pode ser observado o efeito da aplicação foliar de cJ na concentração de genisteína (A) e coumestrol (B) nas raízes da cultivar BRS 133 (suscetível) e da PI 595099 (resistente). Nesse, se observa que as concentrações de genisteína nas raízes



dos genótipos tanto o resistente como o suscetível são quadráticas. A cultivar PI 595099 respondeu mais rapidamente, ou seja, a partir de 48h da aplicação dos tratamentos, enquanto a cultivar suscetível permaneceu inalterada até 96h. Em geral, o aumento na concentração de genisteína foi mais acentuado na PI 595099.

Para concentrações de coumestrol, observou-se uma resposta quadrática (BRS 133) e linear (PI 595099) dos genótipos em relação às horas após a aplicação dos tratamentos (Figura 7B). Na BRS 133, as concentrações permaneceram baixas nas plantas controle até 120h após a pulverização foliar, que, surpreendentemente, aumentou na última avaliação (144h). Na PI 595099, as concentrações de coumestrol aumentaram a partir de 48h.

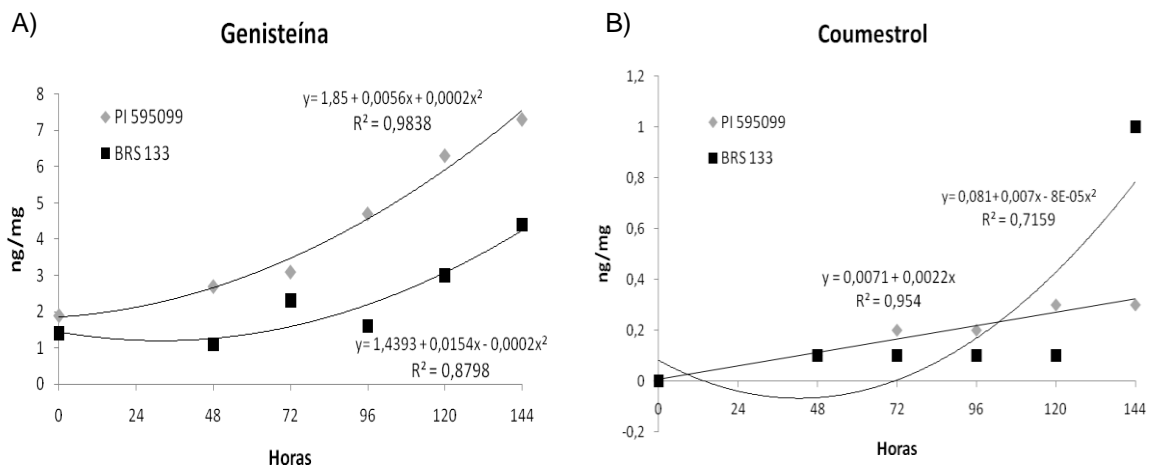


Figura 7. Concentração de genisteína (A) e coumestrol (B) em raízes dos genótipos tratados com pulverização foliar de *cis*-jasmone. Análise de Regressão polinomial para os níveis de hora dentro de genótipo.

A interação genótipo x tratamento foi significativa apenas nas concentrações de daidzeína (Figura 8). Em relação a cultivar suscetível (BRS 133), a PI 595099 apresentou maior concentração do composto e não se observou diferença significativa dos tratamentos (cJ e controle). Por outro lado, as raízes da cultivar BRS 133 apresentaram maior concentração de daidzeína, quando suas folhas foram tratadas com *cis*-jasmone.

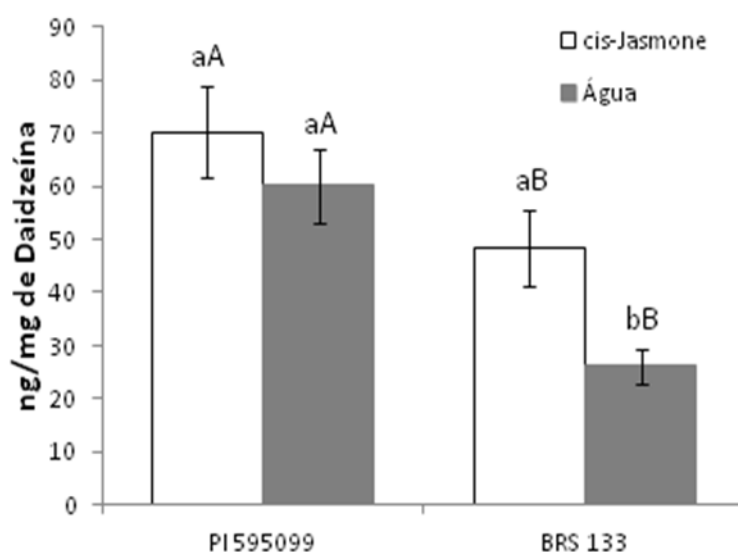


Figura 8. Efeito da interação genótipo x tratamento na concentração de daidzeína em raízes dos genótipos pulverizados com *cis*-jasmone ou controle. O gráfico apresenta dados com as médias originais e significância do ajuste com transformação de  $x^{\wedge} (1 - 0.84033)$ . Letras minúsculas comparam as concentrações dos compostos entre os tratamentos, e letras maiúsculas comparam as concentrações dos compostos entre os genótipos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### Plantas inoculadas com *Meloidogyne javanica*

O efeito da pulverização foliar de *cJ* e da inoculação com *M. javanica* também foi avaliado. Nas análises das raízes, além da atividade da PAL, pode-se observar a produção de daidzina, malonil daidzina, daidzeína e coumestrol.

Pela análise de variância (Quadro 2), observou-se que o efeito de horas foi significativo no aumento da concentração de todos os compostos. Por outro lado, efeito significativo de genótipo foi observado apenas para as concentrações da PAL e de coumestrol e de tratamento para coumestrol.

O efeito da interação genótipo x hora foi significativo no aumento das concentrações de daidzina, enquanto as demais, genótipo x tratamento e hora x tratamento, não foram significativos para os compostos observados. Embora tenha sido observada interação tripla genótipo x hora x tratamento nas concentrações de alguns compostos, devido a sua complexidade, essas não foram interpretadas nesse estudo.

Quadro 2. Resumo da análise de variância (graus de liberdade e valor de F) para atividade da fenilalanina amônia-liase, daidzina, malonil daidzina, daidzeína em plantas tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone e inoculadas com *Meloidogyne javanica*

Fontes de variação	G.L	Valor de F				
		Atividade da PAL	Daidzina	Malonil daidzina	Daidzeína	Coumestrol
Genótipo	1	7.60**	3.85 <sup>ns</sup>	0.35 <sup>ns</sup>	0.96 <sup>ns</sup>	14.54***
Hora	5	63.04***	51.23***	8.63***	29.52***	93.39***
Tratamento	1	0.05 <sup>ns</sup>	0.88 <sup>ns</sup>	0.31 <sup>ns</sup>	0.60 <sup>ns</sup>	4.50*
Gen*Hor	5	1.70 <sup>ns</sup>	2.67*	1.27 <sup>ns</sup>	1.91 <sup>ns</sup>	2.03 <sup>ns</sup>
Gen*Tra	1	1.44 <sup>ns</sup>	0.36 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	1.54 <sup>ns</sup>	1.31 <sup>ns</sup>
Hor*Tra	5	1.67 <sup>ns</sup>	1.62 <sup>ns</sup>	0.86 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	1.85 <sup>ns</sup>
Gen.*Hor*Tra	5	1.44 <sup>ns</sup>	10.15***	3.98**	3.33**	2.50*
Resíduo	69					

\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 e ns – não significativo

Como os efeitos interativos não foram significativos para as concentrações dos compostos analisados, com exceção de genótipo x hora para daidzina, foram apresentadas as médias gerais dos efeitos principais (genótipo, hora e tratamento).

Na figura 9, observa-se que o modelo de regressão ajustado para média de horas foi quadrática na atividade da PAL e na concentração de todos os isoflavonoides observados, exceto para as concentrações de daidzina, que foi linear. A atividade da PAL (A) aumentou mais acentuadamente 72h após inoculação, ou seja, 120h após aplicação dos tratamentos. Concentrações de daidzina (B), em raízes de plantas tratadas com pulverização foliar e inoculadas com *M. javanica*, aumentaram ao longo das horas de coleta. Por outro lado, um acúmulo de malonil daidzina foi observado entre 72h e 120h após inoculação (Figura 9C). Aumento das concentrações de daidzeína (Figura 9D) foi mais acentuado em 120h e 144h após inoculação. Aumento da indução de coumestrol foi de aproximadamente quarenta vezes, atingindo 6,05 ng mg<sup>-1</sup> em 144h após inoculação (Figura 9E).

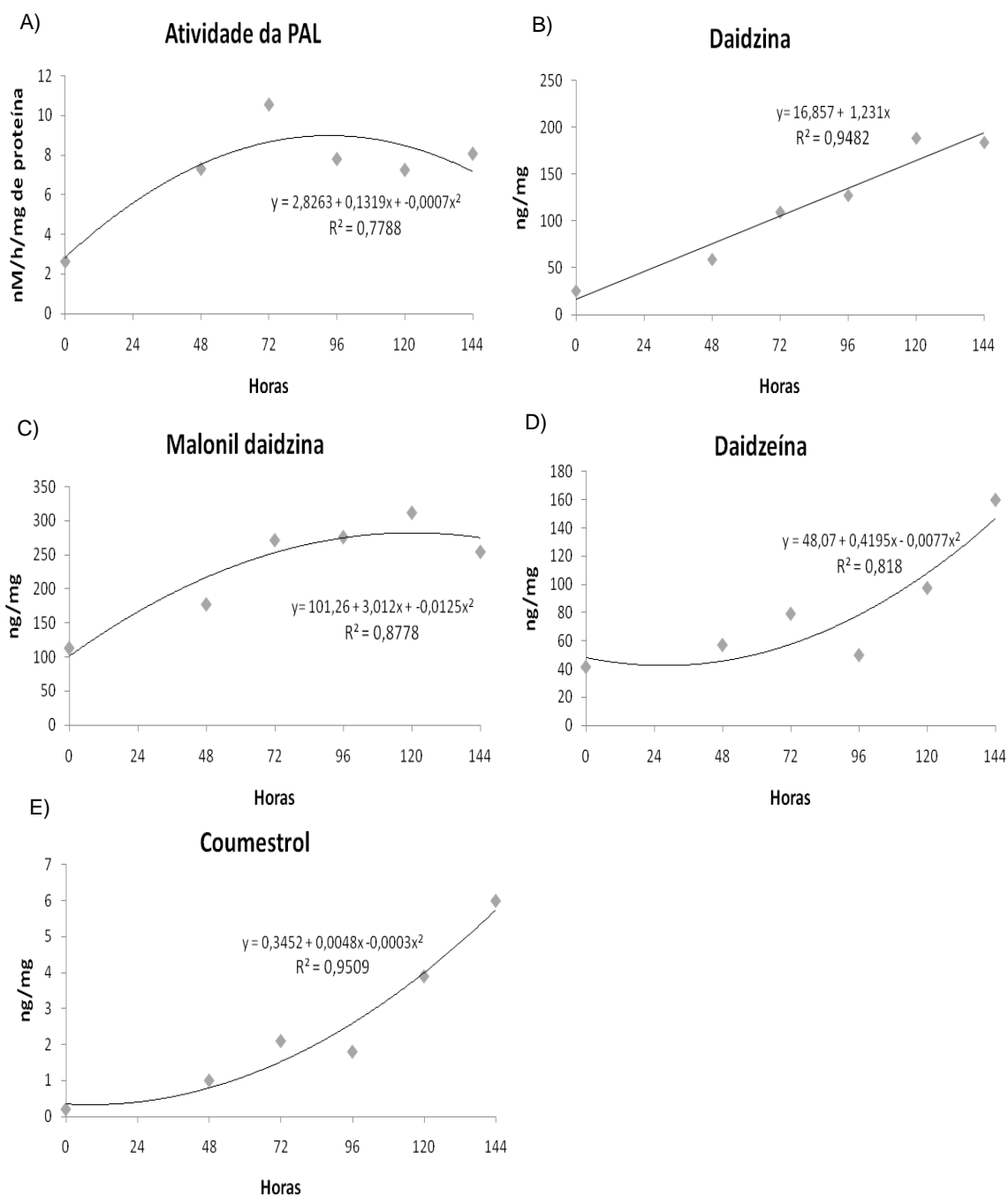


Figura 9. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzina (B), malonil daidzina (C), daidzeína (D) e coumestrol (E) nas raízes de plantas tratadas com pulverização foliar e inoculação com *Meloidogyne javanica*. Análise de regressão polinomial para os níveis de hora.

Na figura 10, observa-se a média geral da atividade da PAL e da concentração de coumestrol nas raízes dos diferentes genótipos. A média geral da atividade da PAL (A) foi significativamente maior no genótipo resistente PI 595099 (7,64 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) que no suscetível (6,91 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Da mesma forma, o acúmulo de coumestrol (B) também foi maior na PI595099 (2,84 ng mg<sup>-1</sup>), quando comparado com a BRS 133 (2,15 ng mg<sup>-1</sup>). A indução desse composto (Figura 11) foi significativamente maior em plantas tratadas com cJ (2,7 ng/mg), quando comparadas com plantas controle (2,3 ng mg<sup>-1</sup>).

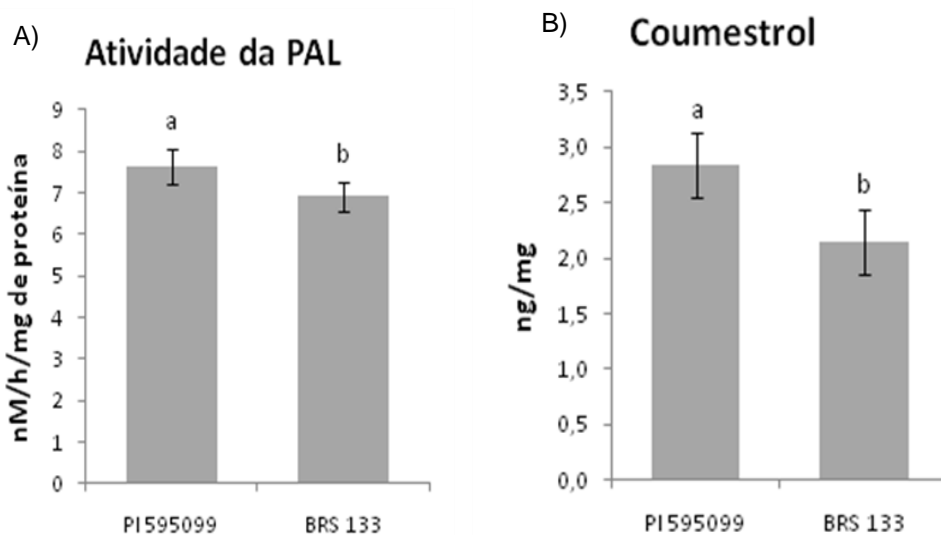


Figura 10. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentração de coumestrol (B) nas raízes dos genótipos tratados com pulverização foliar e inoculados com *Meloidogyne javanica*. Letras minúsculas comparam as concentrações dos compostos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

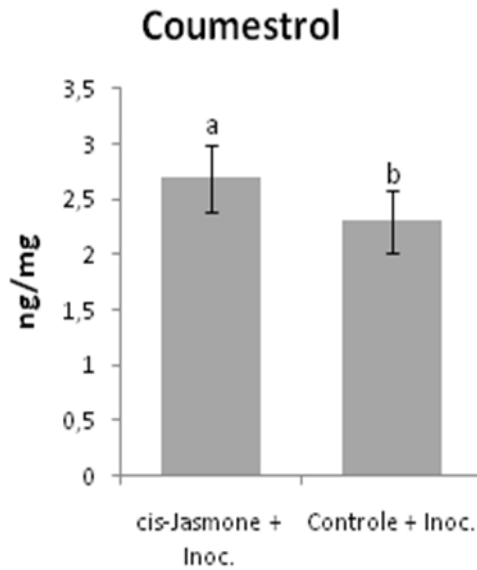


Figura 11. Concentração de coumestrol nas raízes de plantas tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone ou controle e inoculadas com *Meloidogyne javanica*. Letras minúsculas comparam as concentrações dos compostos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na interação genótipo x hora (Figura 12) para daidzina, observa-se que a resposta das raízes dos genótipos tratados com pulverização foliar e inoculados com o nematoide foi linear tanto para o genótipo resistente PI 595099 como para o suscetível BRS 133. Em ambos os genótipos, concentrações de daidzina aumentaram ao longo das horas de coleta, porém, em 144h, a concentração desse isoflavonoide foi mais acentuada na BRS 133.

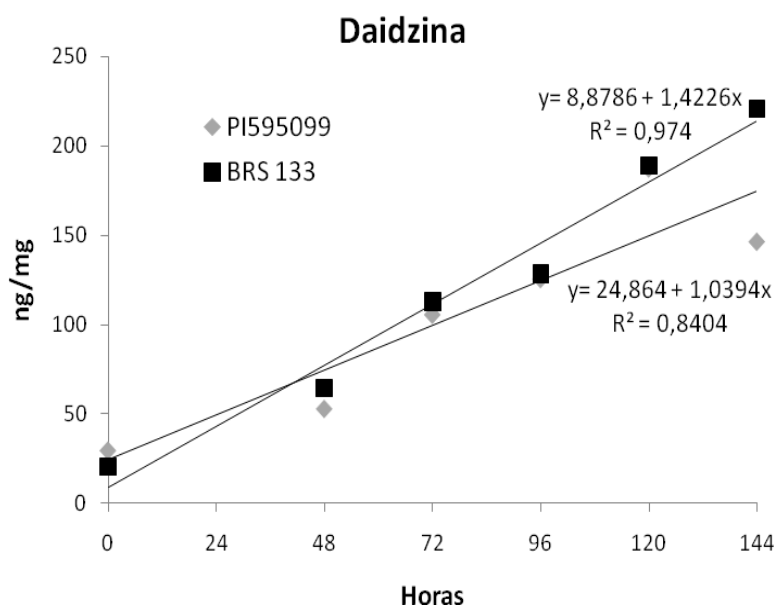


Figura 12. Concentração de daidzina nas raízes da PI 595099 e BRS 133 tratadas com pulverização foliar de *cis*-jasmone ou controle. Análise de regressão polinomial para os níveis de hora dentro de genótipo.

#### 4.2. Efeito do molhamento de solo com *cis*-jasmone na indução de resistência

##### Plantas sem inoculação

Na análise dos efeitos dos genótipos de soja tratados com molhamento de solo, além da atividade da PAL, foram observados nas análises cromatográficas os teores de daidzina, malonil daidzina, daidzeína e coumestrol. Pela análise de variância (Quadro 3), pode se observar que o efeito da interação genótipo x hora não foi significativo apenas para a atividade da PAL. Nas outras interações, observaram-se efeitos significativos de genótipo x tratamento nas concentrações de malonil daidzina e coumestrol, e de horas x tratamento na atividade da PAL e nas concentrações de todos os compostos analisados.

Quadro 3. Resumo da análise de variância (graus de liberdade e valor de F) para atividade da PAL, daidzina, malonil daidzina, daidzeína e coumestrol em plantas tratadas com molhamento do solo com *cis*-jasmone

Fontes de variação	G.L	Valor de F				
		Atividade da PAL	Daidzina	Malonil daidzina	Daidzeína	Coumestrol
Genótipo	1	4.51*	15.78***	35.27***	0.009 <sup>ns</sup>	41.51***
Hora	5	27.15***	12.47***	43.22***	49.12***	285.54***
Tratamento	1	143.94***	169.83***	197.96***	15.95***	950.92***
Gen*Hor	5	1.81 <sup>ns</sup>	4.33**	8.99***	2.79*	7.65***
Gen*Tra	1	3.16 <sup>ns</sup>	1.53 <sup>ns</sup>	16.44***	0.73 <sup>ns</sup>	18.22***
Hor*Tra	5	8.87***	12.48***	11.63***	2.88*	184.39***
Gen.*Hor*Tra	5	1.74 <sup>ns</sup>	0.99 <sup>ns</sup>	3.86**	2.42*	3.22*
Resíduo	69					

\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 e ns – não significativo.

Como os efeitos interativos entre genótipo e tratamento e entre genótipo e hora não foram significativos na atividade da PAL, na Figura 13, foram apresentadas as médias gerais dos genótipos obtidas em ambos os tratamentos em todo o período de avaliação. Nessa figura, observa-se que a atividade da PAL foi significativamente maior na PI 595099 (4,11 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) quando comparado com a BRS 133 (3,71 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína).

Na Figura 14, são apresentadas as análises de regressão relacionadas à interação hora x tratamento. O modelo ajustado para o controle foi linear no aumento da atividade da PAL, enquanto que para tratamento com cJ foi quadrática. Nas plantas controle, a atividade da PAL (Figura 14A) foi maior que nas plantas tratadas com cJ, aumentando ao longo das horas de coleta. Porém, em plantas tratadas com cJ, a atividade da enzima aumentou a partir de 96h após aplicação.



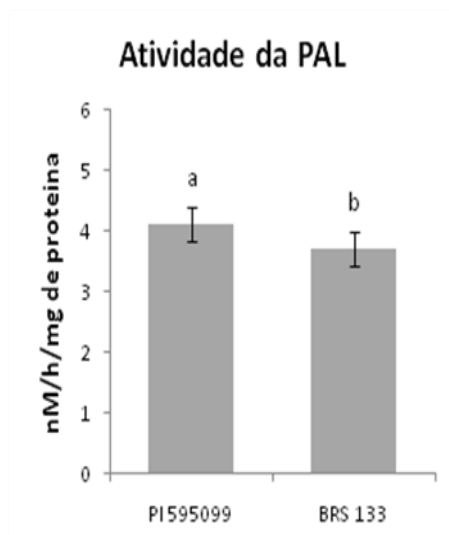


Figura 13. Média geral da atividade da fenilalanina amônia-liase em raízes de PI 595099 e BRS 133 em todas as horas de avaliação e em ambos os tratamentos com molhamento do solo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Concentrações de daidzina, malonil daidzina, daidzeína e coumestrol também foram mais acentuadas em plantas controle, comparadas com plantas tratadas com cJ. Nessas plantas, observa-se que a concentração de daidzina (Figura 14B) e malonil daidzina (Figura 14C) manteve-se alta entre 48h e 96h, diminuindo em 120h após tratamento. Por outro lado, em 120h após tratamento, as plantas controle tiveram um acúmulo de daidzeína (Figura 14D) e coumestrol (Figura 14E). As respostas das raízes ao molhamento do solo foram quadráticas para todos os isoflavonoides analisados em ambos os tratamentos, exceto para coumestrol tratado com cJ, que foi linear.

Em plantas tratadas com cJ (Figura 14), observaram-se maiores concentrações de daidzina e malonil daidzina nas primeiras horas de coleta (48h e 72h), diminuindo após 96h do tratamento. Concentração de daidzeína aumentou mais acentuadamente 120h e 144h após tratamento com cJ, e indução de coumestrol foi observada ao longo das horas de coleta.

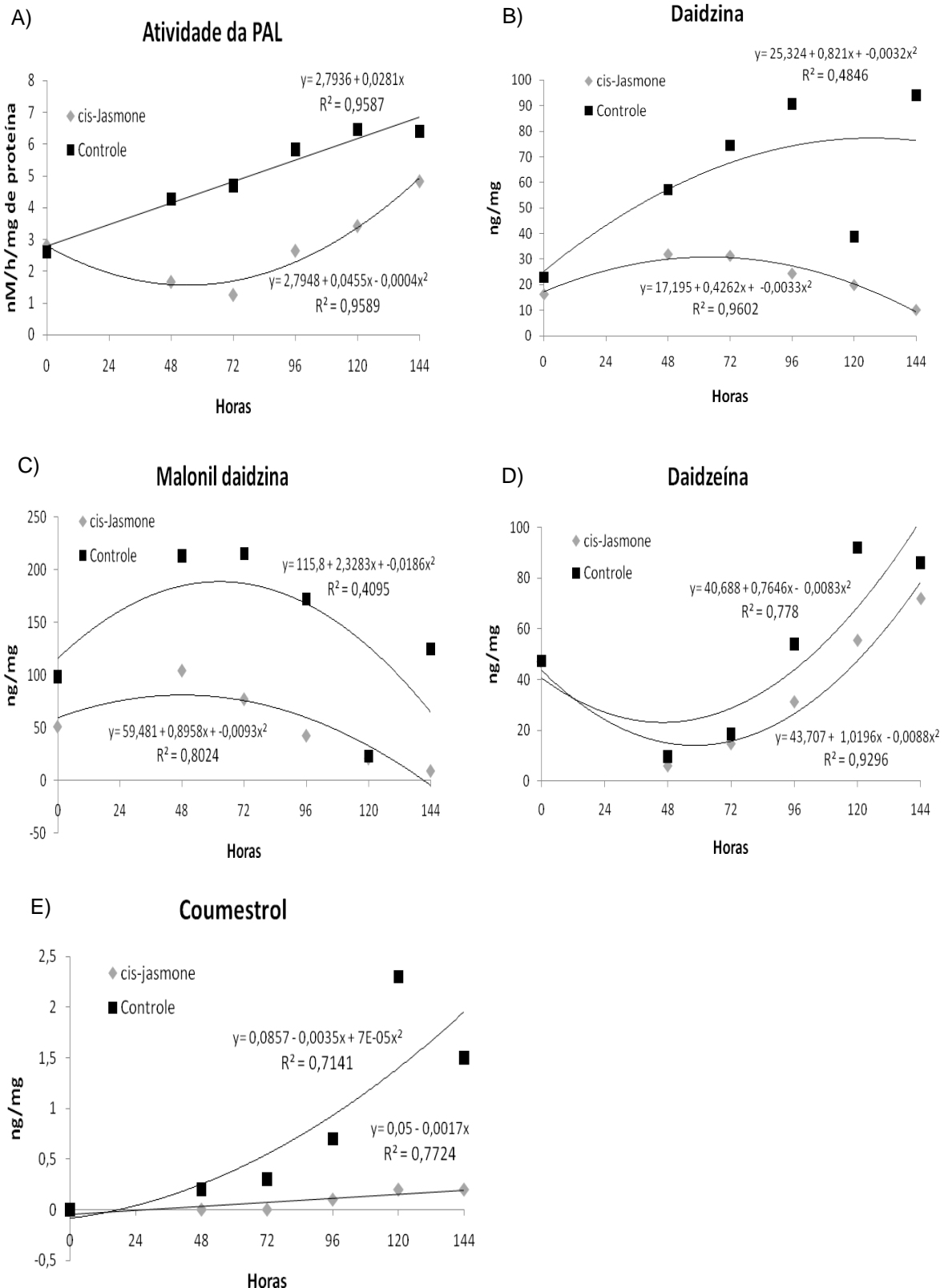


Figura 14. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzina (B), malonil daidzina (C), daidzeína (D) e coumestrol (E) em raízes tratadas com molhamento de solo com *cis*-jasmone ou controle. Análise de regressão polinomial para os níveis de hora dentro de tratamento.

Na Figura 15, observam-se os efeitos significativos da interação genótipo x hora. Nesse, as respostas das raízes dos genótipos tanto o resistente como o suscetível, foram quadráticas. De modo geral, as concentrações de daidzina (15A), malonil daidzina (15B), daidzeína (15C) e coumestrol (15D) foram maiores na BRS 133 que na PI 595099.

Concentrações de daidzina (Figura 15A) permaneceram maiores nas primeiras horas de coleta (48h, 72h e 96h), diminuindo após 120h, em ambos os genótipos. Um aumento acentuado de malonil daidzina entre 48h e 96h, diminuindo em 120h após tratamento, foi observado na BRS 133. Na PI 595099, concentrações de malonil daidzina aumentaram em 48h e 72h, diminuindo após 96h de tratamento (Figura 15B). Contrariamente, concentrações de daidzeína (Figura 15C) aumentaram em 120h e 144h após tratamento em ambos os genótipos. Tanto no genótipo resistente como no suscetível, foi observado um aumento acentuado de coumestrol em 120h após tratamento (Figura 15D).

A interação genótipo x tratamento foi significativa a pelo menos 5% de probabilidade nas concentrações de malonil daidzina e coumestrol. Concentrações de malonil daidzina (Figura 16A) foram maiores em plantas controle em relação às plantas tratadas com cJ, para ambos os genótipos. Em plantas controle, o genótipo suscetível (BRS 133) apresentou maiores concentrações de malonil daidzina, em relação ao genótipo resistente (PI 595099), e não se observaram diferenças significativas entre os genótipos tratados com cJ. Da mesma forma, concentrações de coumestrol (Figura 16B), tanto na PI 595099 como na BRS 133, foram maiores quando tratados com solução controle em relação ao tratamento com cJ. Em plantas controle, as concentrações desse composto foram maiores na BRS 133 que na PI 595099, não havendo diferenças significativas entre os genótipos tratados com cJ.

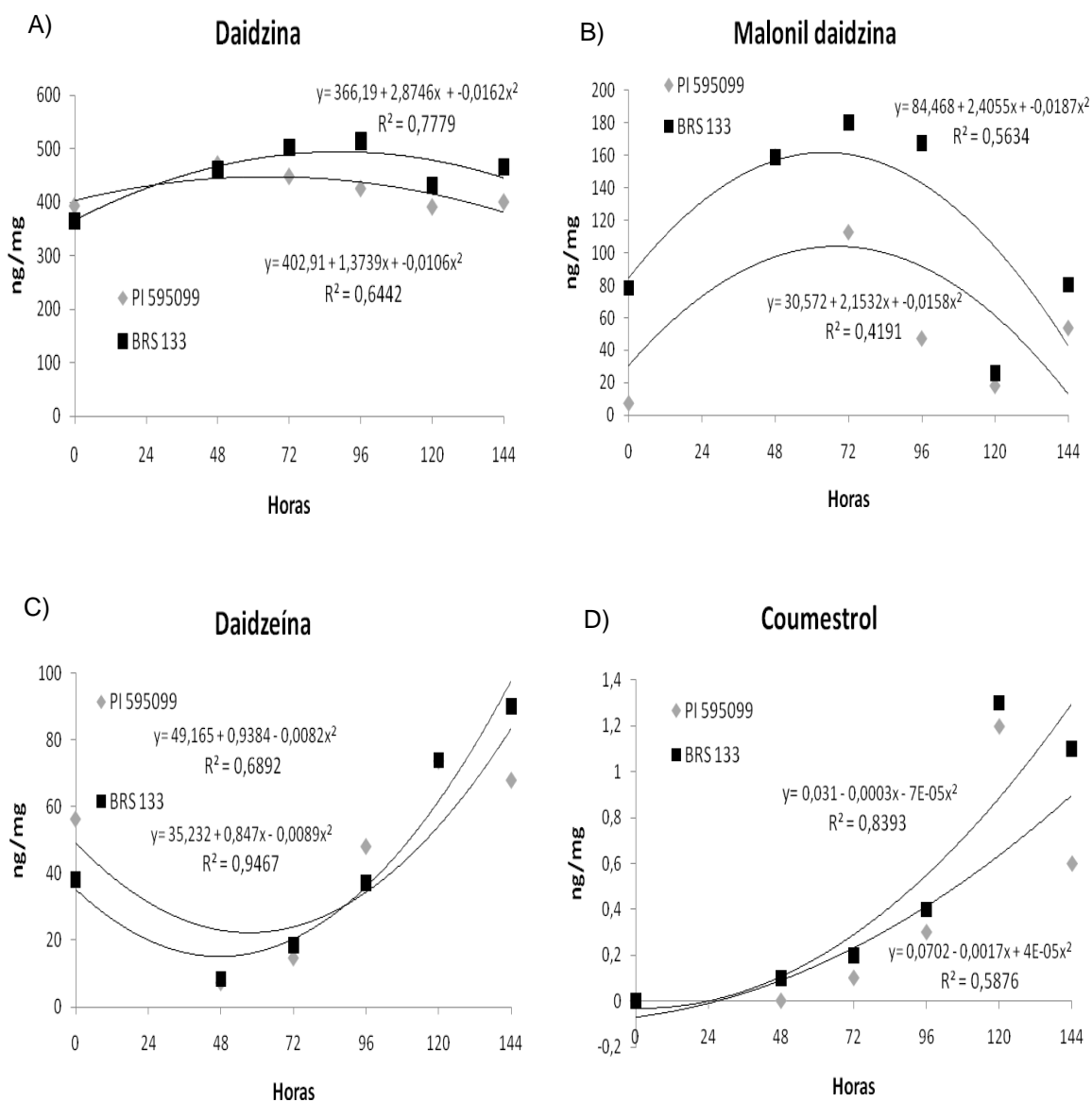


Figura 15. Concentração de daidzina (A), malonil daidzina (B), daidzeína (C) e coumestrol (D) em raízes dos genótipos PI 595099 e BRS 133, ambos com tratamento por molhamento do solo. Análise de Regressão polinomial para os níveis de hora dentro de genótipo.

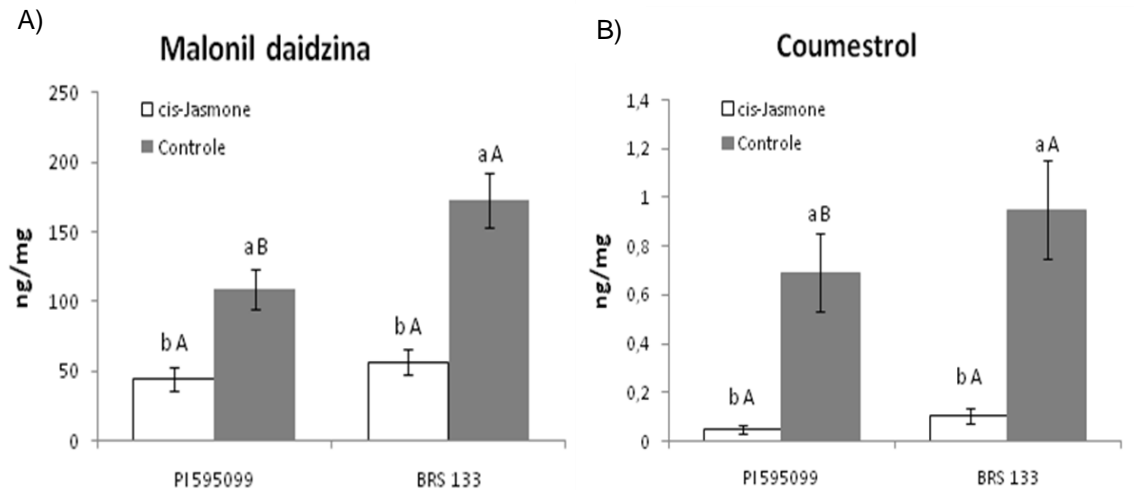


Figura 16. Efeito do molhamento do solo com *cis*-jasmone ou controle na interação genótipo x tratamento para as concentrações de malonil daidzina (A) e coumestrol (B). Letras minúsculas comparam as concentrações dos compostos entre tratamentos, e letras maiúsculas comparam as concentrações dos compostos entre genótipos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### Plantas inoculadas com *Meloidogyne javanica*

Efeito do molhamento do solo com *cis*-jasmone e da inoculação com *M. javanica* foi avaliado, e, após as análises cromatográficas, foram obtidas a atividade da PAL e as concentrações de daidzina, malonil daidzina e coumestrol.

Pela análise de variância (Quadro 4), observa-se efeito significativo de genótipo para a atividade da PAL e coumestrol, e de hora e tratamento para todos os compostos analisados. Observaram-se efeitos significativos nas interações de hora x tratamento para atividade da PAL e concentrações de daidzina e coumestrol, e de genótipo x hora para concentrações de coumestrol. A interação genótipo x tratamento não foi significativa apenas para atividade da PAL.

Quadro 4: Resumo da análise de variância (graus de liberdade e valor de F) para atividade da fenilalanina amônia-liase, daidzina, malonil daidzina e coumestrol em plantas tratadas com molhamento do solo e inoculadas com *Meloidogyne javanica*.

Fontes de variação	G.L	Valor de F			
		Atividade da PAL	Daidzina	Malonil daidzina	Coumestrol
Genótipo	1	25.12***	8.16**	1.74 <sup>ns</sup>	1.08 <sup>ns</sup>
Hora	5	15.42***	56.25***	6.56***	50.33***
Tratamento	1	26.08***	46.80***	71.78***	4.98*
Gen*Hor	5	0.18 <sup>ns</sup>	1.91 <sup>ns</sup>	1.34 <sup>ns</sup>	16.16***
Gen*Tra	1	0.007 <sup>ns</sup>	4.87*	6.98**	3.96*
Hor*Tra	5	2.46*	2.94*	1.32 <sup>ns</sup>	8.88***
Gen.*Hor*Tra	5	1.60 <sup>ns</sup>	1.81 <sup>ns</sup>	2.15 <sup>ns</sup>	9.23***
Resíduo	69				

\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 e ns – não significativo

Como o efeito interativo entre genótipo x hora e genótipo x tratamento não foi significativo para a atividade da PAL, na Figura 17, foi apresentada a média geral dos genótipos obtida em ambos os tratamentos em todos os períodos de avaliação. A atividade da PAL em raízes de plantas tratadas com molhamento de solo + inoculação foi maior na PI 595099 (5,7 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) em relação à BRS 133 (4,1 nM h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína).

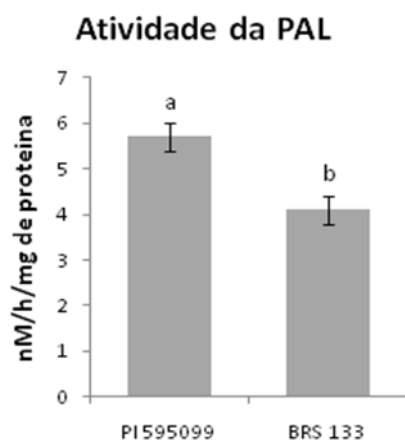


Figura 17. Média geral da atividade da fenilalanina amônia-liase nas raízes de genótipos PI 595099 e BRS 133 em todas as horas de avaliação e em ambos os tratamentos com molhamento do solo e inoculação com *Meloidogyne javanica*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os gráficos das curvas de regressão para interação hora x tratamento são ilustrados na Figura 18. O modelo ajustado para atividade da PAL (A) foi quadrático, em ambos os tratamentos. A atividade da PAL, em plantas controle, teve um aumento acentuado em 72h após inoculação, e, em plantas tratadas com cJ, esse aumento foi observado em 120h após inoculação. Porém, a atividade da enzima foi maior nas plantas controle.

As concentrações de daidzina e coumestrol aumentaram mais acentuadamente em 144h após aplicação de cJ, enquanto que no controle houve um aumento ao longo das horas de coleta. O modelo ajustado para *cis*-jasnone foi quadrático nas concentrações de daidzina e coumestrol, enquanto que nas plantas controle foi linear (Figura 18B, C).

Na figura 19, é apresentado o efeito da interação genótipo x hora para a concentração de coumestrol. Observou-se uma resposta quadrática (BRS 133) e linear (PI 595099) dos genótipos em relação às horas de coleta. As concentrações de coumestrol na cultivar BRS 133 permaneceram baixas até 120h após inoculação e acentuadamente aumentou em 144h após inoculação. Na PI 595099, a concentração da fitoalexina aumentou ao longo das horas de coleta.

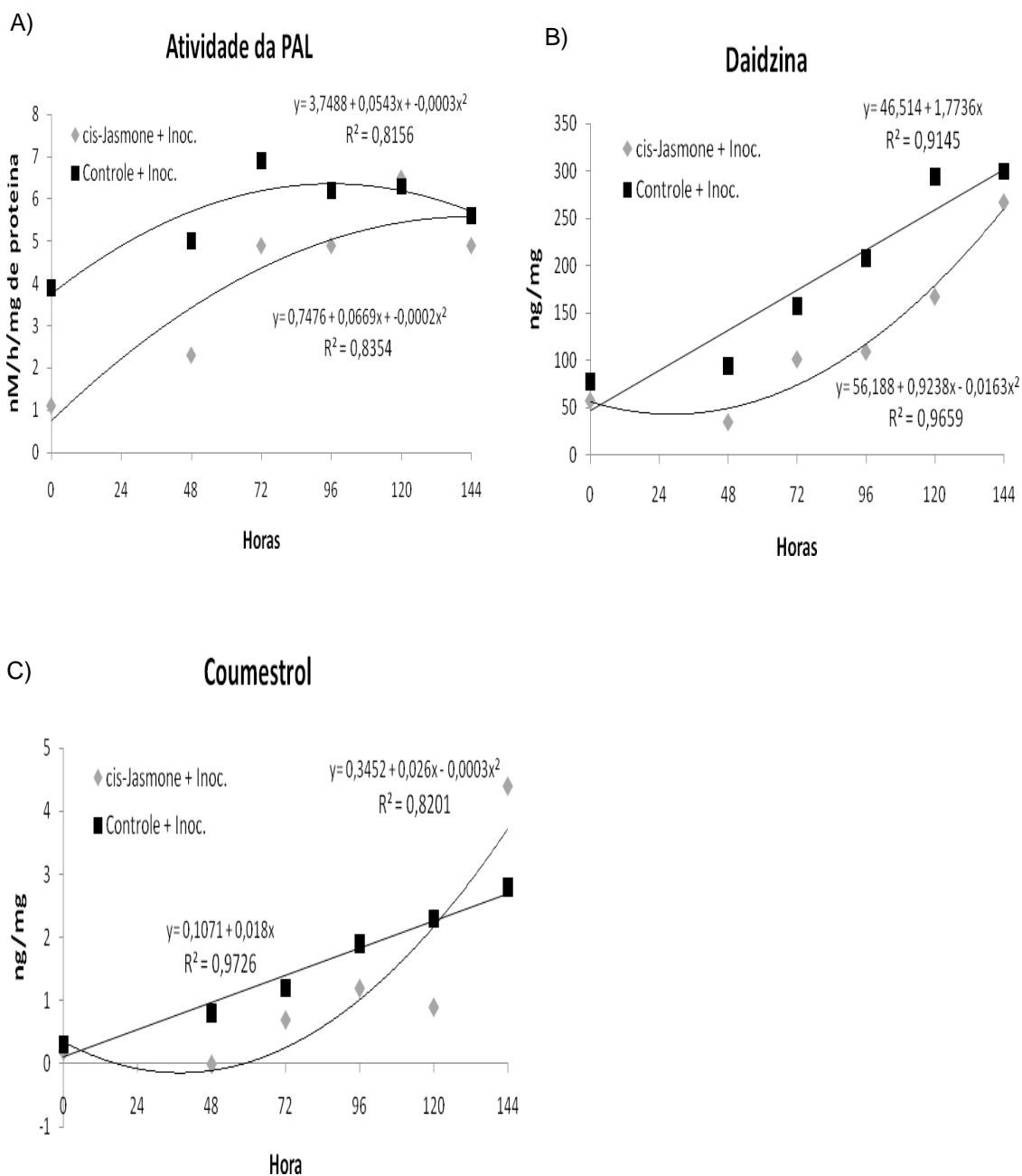


Figura 18. Atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e concentrações de daidzina (B) e coumestrol (C) em raízes de plantas tratadas com molhamento do solo e inoculadas com *Meloidogyne javanica*. Análise de regressão polinomial para os níveis de hora dentro de tratamento.



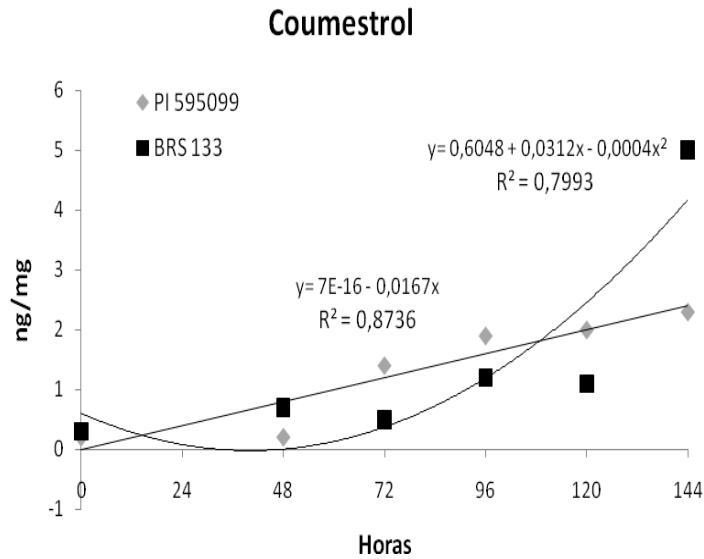


Figura 19. Concentração de coumestrol em raízes dos genótipos de soja PI 595099 e BRS 133 tratados com molhamento do solo e inoculadas com *Meloidogyne javanica*. Análise de regressão polinomial para os níveis de horas dentro de genótipo.

Na interação genótipo x tratamento, as concentrações de daidzina (Figura 20A) foram maiores nas plantas tratadas com solução controle para ambos os genótipos. Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos tratados com *cis*-jasmone, mas, nas plantas controle, a concentração de daidzina foi maior na PI 595099 (212,6 ng mg<sup>-1</sup>) que na BRS 133 (164,1 ng mg<sup>-1</sup>). Da mesma forma, concentrações de malonil daidzina (Figura 20B), para os dois genótipos analisados, foram maiores em plantas controle. Não houve diferenças significativas entre os genótipos tratados com *cJ*, mas, nas plantas controle, houve um maior acúmulo de malonil daidzina na PI 595099 (418,9 ng mg<sup>-1</sup>) em relação à BRS 133 (339,1 ng mg<sup>-1</sup>).

Por outro lado, concentrações de coumestrol (Figura 20C) foram maiores no genótipo suscetível (1,5 ng mg<sup>-1</sup>) que no resistente (1 ng mg<sup>-1</sup>) tratadas com *cJ*, não havendo diferenças entre BRS 133 e PI 595099 tratadas com solução controle. Na PI 595099, a indução de coumestrol foi significativamente maior no tratamento com solução controle em relação ao *cJ*. Na BRS 133, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Assim, concentrações de coumestrol foram menores somente na PI 595099, tratada com *cJ*.

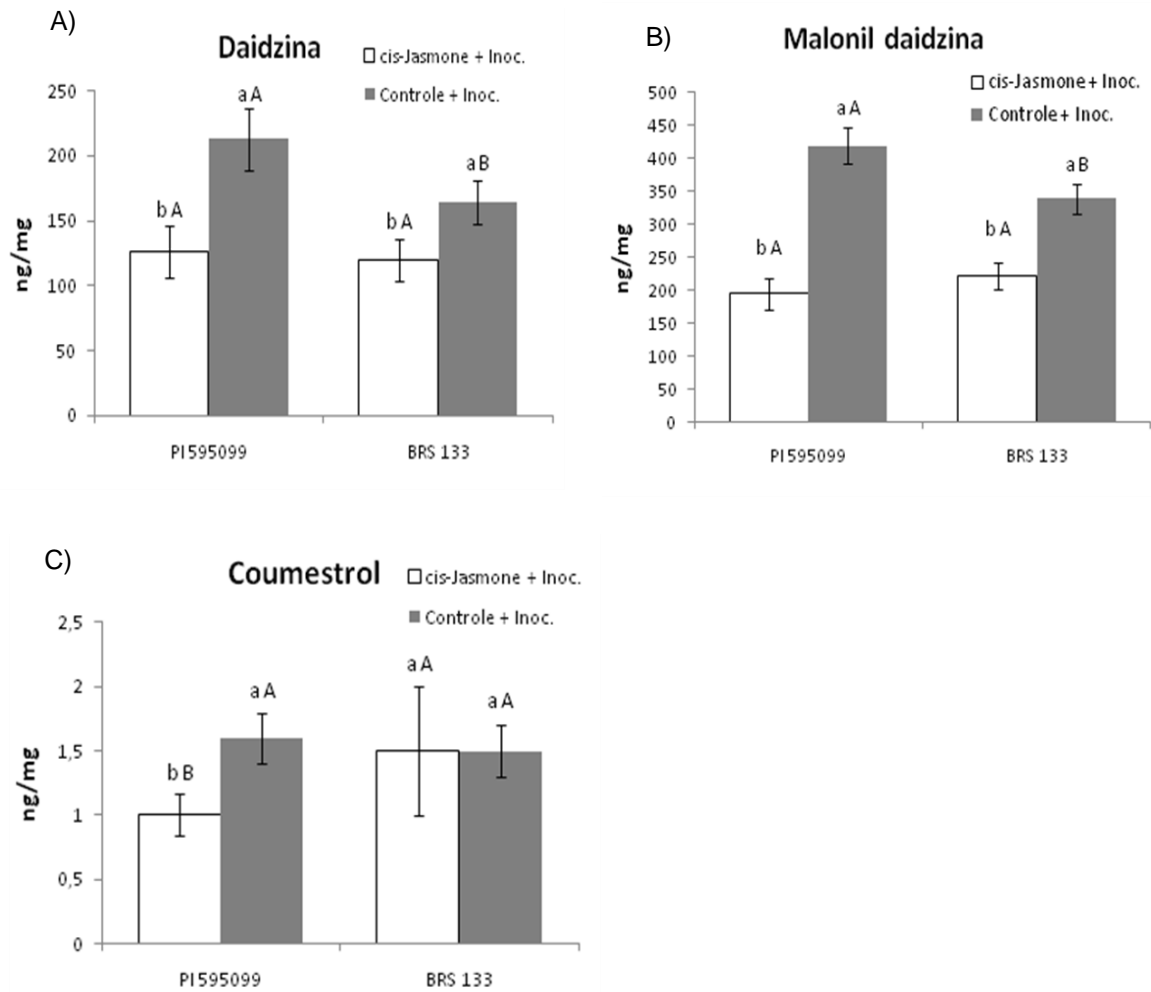


Figura 20. Efeito do molhamento do solo com *cis*-jasmone ou controle e inoculação com *Meloidogyne javanica* na interação genótipo x tratamento para concentrações de daidzina (A), malonil daidzina (B) e coumestrol (C). Letras minúsculas comparam as médias dos compostos dentro do genótipo, e letras maiúsculas comparam as médias entre os genótipos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.3. Efeito do *cis*-jasmone no fator de reprodução do nematoide

Pela análise de variância (Quadro 5), observa-se que o fator de reprodução do nematoide foi significativo para genótipo, não havendo efeitos significativos para o fator tratamento e para interação genótipo x tratamento.

Quadro 5. Resumo da análise de variância (graus de liberdade e valor de F) para o fator de reprodução do nematoide em plantas tratadas com pulverização foliar ou molhamento do solo com *cis*-jasmone

Fonte de Variação	GL	Valor de F	
		Pulverização foliar	Molhamento do solo
Genótipo	1	26.69***	54.86***
Tratamento	1	0.67 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>
Genótipo x Tratamento	1	0,80 <sup>ns</sup>	2,92 <sup>ns</sup>

\*\*\*P < 0,001 e ns – não significativo

O fator de reprodução do nematoide nos genótipos tratados com pulverização foliar de cJ (Figura 21) foi significativamente maior na BRS133 (FR 26,2) que na PI 595099 (FR 10,7). A multiplicação do nematoide na BRS 133 tratada com cJ foi de FR 24,8 e no controle foi de FR 27,5; entretanto, diferença significativa entre os tratamentos não foram observadas. Embora a PI 595099 tratada com cJ tenha apresentado FR 9 e tratada com solução controle tenha apresentado FR 12,5, também não foram significativamente diferentes pelo teste Tukey à 5% de probabilidade.

Na avaliação do fator de reprodução das plantas tratadas com molhamento de solo (Figura 22), foram observadas diferenças significativas entre os genótipos. Na BRS 133 (FR 252,8), a multiplicação do nematoide foi significativamente maior que na PI 595099 (FR 138,1). Nas BRS 133 tratadas com cJ, a multiplicação do nematoide foi de FR 236,4, enquanto que, no tratamento com solução controle, foi de FR 269,2. Na PI 595099, a multiplicação do nematoide foi de FR 129,7 quando tratada com cJ e de FR 146,5 quando tratada com solução controle. Todavia, o efeito de tratamento não foi significativamente diferente em plantas tratadas com molhamento do solo.

Ao comparar os gráficos que expressam a multiplicação do nematoide entre os dois tipos de aplicação, podemos observar que o fator de reprodução do nematoide em plantas tratadas com molhamento de solo foi maior que em plantas tratadas com pulverização foliar.

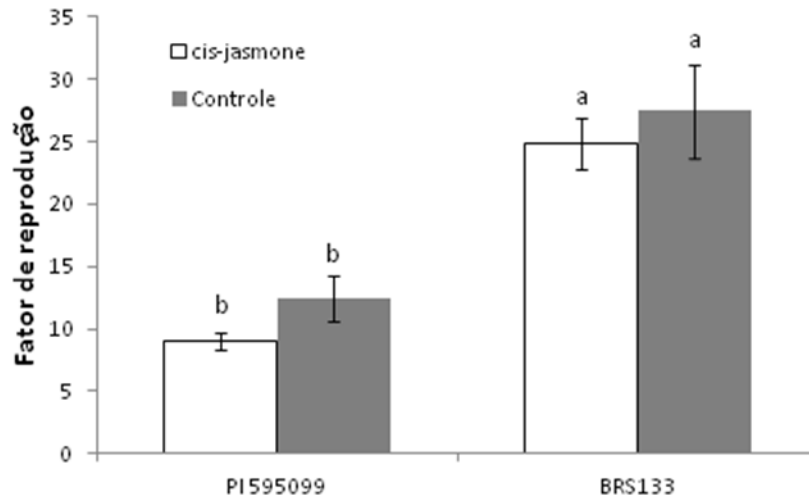


Figura 21. Efeito da pulverização foliar de *cis*-jasmone no fator de reprodução de *Meloidogyne javanica*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

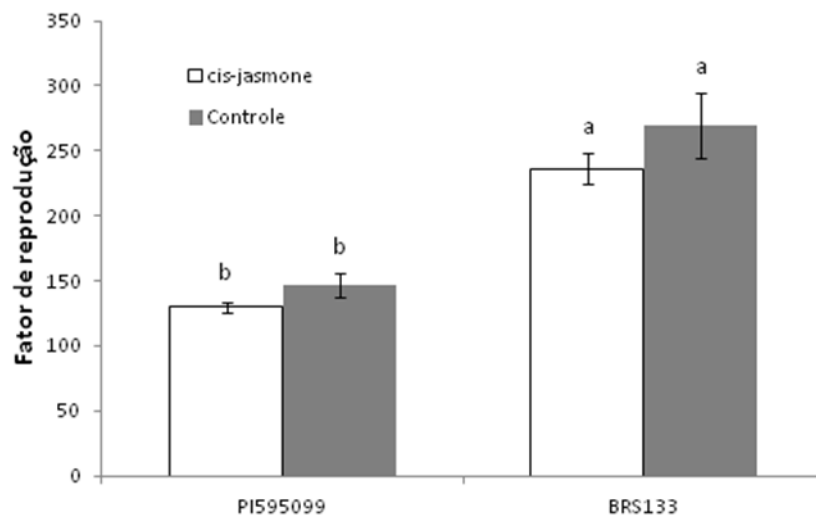


Figura 22. Efeito do molhamento de solo com *cis*-jasmone no fator de reprodução de *Meloidogyne javanica*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## 5. DISCUSSÕES

### 5.1. Efeito da pulverização foliar com *cis*-jasmone na indução de resistência

Os resultados destes estudos demonstraram que a aplicação foliar com *cJ* aumentou a atividade da PAL e as concentrações das isoflavonas daidzeína, genisteína e do coumestan coumestrol de forma sistêmica. Substâncias essas envolvidas na resistência de soja a estresses bióticos, como lagartas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006), percevejos (PIUBELLI et al., 2003), fitóftora (GRAHAM et al., 1990) e ferrugem asiática (LYGIN et al., 2009). A indução sistêmica em soja foi também observada por Park et al. (2002), que, avaliando os efeitos de JA, MeJA e outros indutores químicos, observaram um acúmulo de daidzeína e genisteína em tecidos distantes do ponto de indução. Como alguns genes que codificam para compostos de defesa estão sob controle da rota do jasmonato (TURNER et al., 2002), a pulverização com *cJ* pode ter desencadeado a síntese dos isoflavonoides como resposta de defesa da soja.

Alguns estudos têm demonstrado que os jasmonatos aplicados exogenamente podem desencadear a síntese de uma ampla gama de metabólitos secundários e proteínas envolvidos na defesa de diversas espécies de plantas. Por exemplo, aplicação exógena de jasmonatos induz a síntese de 20-hidroxiecdisona em espinafre (SORIANO et al., 2004a), flavona-C-glicosídeos em aveia (SORIANO et al., 2004b), nicotina em tabaco (BALDWIN et al., 1994), antocianinas em plântulas de trigo sarraceno (HORBOWICZ et al., 2009), polifenol oxidase e inibidores de proteinase em tomate (THALER et al., 2002; THALER et al., 1996) e PAL em folhas jovens de alface (CAMPOS-VARGAS & SALTVEIT, 2002) e frutos de pêssego (JIN et al., 2009).

Nos experimentos realizados neste trabalho, o aumento da atividade da PAL ocorreu 96h e 120h após aplicação foliar com *cJ*, podendo, na sequência, estar relacionado com o aumento da síntese dos isoflavonoides em 120h e 144h após aplicação. Estes resultados indicam que *cJ* induziu a atividade da PAL, e esta enzima desencadeou a síntese de compostos relacionados com a

defesa de plantas de soja. Segundo Dixon e Paiva (1995), o aumento na atividade da PAL é a chave para a produção de muitos compostos de defesa. Em plântulas de cevada, Walters et al. (2002) observaram que a aplicação exógena de MeJA aumentou os níveis de poliaminas livres, e essas alterações foram acompanhadas pelo aumento da atividade da PAL e outras enzimas relacionadas a defesa. Da mesma forma, a atividade da PAL também foi induzida por MeJA em soja, de modo que a síntese de daidzeína, genisteína e isoflavonas totais aumentaram (MA & ZHAO, 2011).

Na soja, as substâncias químicas de defesa, em geral flavonoides, são constitutivamente mais abundantes nos genótipos resistentes a pragas, como as lagartas *Heliothis virescens* e *Tricoplusia ni* (HOFFMANN-CAMPO 1995) e *Anticarsia gemmatilis* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Adicionalmente, nesses genótipos, via de regra, observa-se um aumento (indução) de isoflavonas conjugadas, como daidzina e genistina, em vagens de soja danificadas pelo percevejo *Nezara viridula* (PIUBELLI et al., 2003). Embora as formas conjugadas daidzeína e genisteína sejam compostos constitutivos em soja, observa-se aumento de suas concentrações após elicitação, podendo inclusive, nesse caso, observar-se a ocorrência de agliconas. Em trabalhos conduzidos em soja, a cultivar resistente ao nematoide *M. incognita*, FT-Cometa, apresentou maior concentração de daidzeína que a cultivar suscetível Pickett 71 (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2005). Com base nos resultados deste trabalho, pode-se observar que, de um modo geral, a atividade da PAL, a concentração de daidzeína e genisteína e a produção de coumestrol também foram maiores em plantas resistentes, tratadas com cJ, sugerindo que esses compostos podem ser responsáveis pela defesa da plantas também aos nematoides.

Graham (1991), ao estudar a distribuição de isoflavonoides durante o desenvolvimento da soja, observou que daidzeína e seus conjugados encontram-se predominantemente em secções de raiz, particularmente em radículas. Na avaliação dos genótipos de soja tratados com cJ ou controle e inoculadas com *M. javanica*, observaram-se altas concentrações de daidzina, malonil daidzina e daidzeína. Embora não tenha sido feita análise de correlação entre plantas não inoculadas e inoculadas com o nematoide dentro

do tratamento com pulverização foliar, podemos observar que as concentrações desses compostos foram mais elevadas nas plantas inoculadas.

Por outro lado, a indução da fitoalexina coumestrol, em plantas inoculadas, foi maior no genótipo resistente, tratado com cJ. Considerando-se que a biossíntese de compostos fenólicos é um dos componentes da resistência a nematoides (GIEBEL, 1973), o coumestrol pode estar relacionado a respostas de resistência da soja à *M. javanica*. Mahajan et al. (1992) observaram alta atividade nematicida do coumestrol, levando a 100% de mortalidade de *M. incognita*.

A indução da síntese de fitoalexinas em raízes de diversas plantas em resposta a nematoides parasitas é bem documentada. Por exemplo, altas concentrações de fitoalexinas, como medicarpina, foram observadas em *Medicago sativa* (BALDRIDGE et al., 1998) e coumestrol em *Phaseolus lunatus* (VEECH, 1982) após inoculação com *Pratylenchus* spp. Outras fitoalexinas, como as gliceolinas, têm sido relacionadas à resistência da soja a *M. incognita* e *Heterodera glycines* após inoculação, mas não tem sido observado acúmulo destas fitoalexinas em soja inoculada com *M. javanica* (HUANG e BARKER, 1991, VEECH, 1982, KAPLAN, et al., 1980). Também, nas análises cromatográficas realizadas neste estudo, não foi possível visualizar os picos correspondentes às gliceolinas, em todos os tratamentos inoculados com o nematoide de galha.

Em relação ao tempo necessário para aumentar a concentração de isoflavonoides constitutivos ou a síntese de fitoalexinas, nestes experimentos, observou-se que as concentrações de glicosil daidzina e malonil daidzina aumentaram em 120h, diminuindo em 144h após inoculação. Além disso, observou-se aumento da concentração de daidzeína (aglicona) e de coumestrol, indicando que conjugados de daidzeína estão relacionados com um aumento da síntese de coumestrol. Resultados semelhantes são relatados por Graham et al. (1990), em que as concentrações da aglicona daidzeína e de gliceolinas aumentam mais rapidamente (48h após infecção por *Phytophthora megasperma*), ao mesmo tempo em que conjugados de daidzina, incluindo glicosídeo, podem ou não diminuir.

## **5.2. Efeito do molhamento do solo com *cis*-jasmone na indução de resistência**

Sinais de defesas de plantas, como a ocorrência de ácido salicílico, ácido jasmônico e metil jasmonato, têm sido relatadas como indutoras de resistência local e sistêmica em plantas a vários patógenos (YANG et al., 1997). Na avaliação do efeito de cJ em plantas tratadas com molhamento do solo, foi observado que a indução local não conduziu às respostas de defesa das plantas, pois a atividade da PAL, a concentração de daidzeína e seus conjugados, e a indução de coumestrol foram maiores nas plantas controle. Diferentemente dos resultados obtidos nesse trabalho, Soriano et al. (2004b) observaram que o molhamento de solo com MeJA induziu a síntese de flavona-C-glicosídeo em raiz de plantas de aveia, promovendo resistência a nematoides. Da mesma forma, Farag & Paré (2002) observaram que MeJA induziu no local, mas não de forma sistêmica, a produção de monoterpenos e sesquiterpenos em plantas de tomate. Essa divergência encontrada entre os resultados pode estar relacionada ao fato de que a resposta da planta ao cJ seja diferente à encontrada por MeJA. Outro fator que pode ter influenciado a inibição dos compostos de defesa foi a concentração de cJ utilizada para o molhamento, visto que essa concentração foi baseada em recomendações para aplicação foliar. Além disso, de acordo com Zhang & Baldwin (1997), os jasmonatos são transportados das folhas para as raízes, onde podem ter uma ampla gama de efeitos no desenvolvimento e metabolismo das plantas. Portanto, quando se molhou o solo com cJ, que é o seu local de atuação, ou seja, nas raízes de soja, ele pode não ter surtido efeitos na produção de metabólitos secundários.

Ao avaliar os genótipos de soja tratados com molhamento do solo + inoculação, observou-se maior atividade da PAL e concentração de isoflavonoides na PI 595099 (resistente) tratada com solução controle (sem a aplicação de cJ), indicando que essa resposta possivelmente foi mediada por respostas de defesa das plantas ao nematoide e não induzida pelo tratamento. Ainda, segundo Edens et al. (1995), a transcrição da PAL aumenta em



cultivares resistentes à *M. incognita* e diminui em cultivares suscetíveis após infecção.

A indução de coumestrol foi semelhante nos genótipos PI 595099 e BRS 133 tratados com solução controle, sugerindo que o nematoide induziu esse composto tanto no genótipo resistente quanto no suscetível. Similarmente, Landini et al. (2003) observaram acúmulo de coumestrol na cultivar de soja Williams, universalmente aceita como suscetível, após indução com glucano da parede celular de *P. sojae*. Acúmulos de coumestrol também foram observados em feijão fava, após indução local com nematoides, mas nenhuma síntese ocorreu em feijoeiro suscetível (RICH et al., 1977).

### **5.3. Efeito do *cis*-jasmone no fator de reprodução do nematoide**

Não foi observado efeito da aplicação de cJ no fator de reprodução do nematoide, sendo este influenciado apenas pelo fator genótipo. O fator de reprodução do nematoide, que estima a viabilidade do hospedeiro, foi maior quando as fêmeas se alimentaram com a cultivar BRS 133 do que na PI 595099. Entretanto efeitos do cJ sob pragas foi relatado por Bruce et al. (2003), que verificaram diminuição da taxa de crescimento do afídeo *Stobion avenae*, além da redução de infestação da população em plantas de trigo tratadas com *cis*-jasmone. Trabalhos conduzidos por BIRKET et al. (2000) mostraram um efeito indireto na defesa, ou seja, plantas de feijão tratadas com cJ foram mais atrativas a parasitoides de afídeos; deste modo, as plantas potencialmente tiveram a resistência aumentada devido a interações tritróficas.

Outros estudos realizados com compostos pertencentes à mesma rota metabólica têm demonstrado efeito na reprodução de nematoides. Como exemplo, a aplicação foliar de ácido jasmônico em tomate induziu efeitos sistêmicos que reduziram o desenvolvimento dos nematoides de galha (COOPER et al., 2005). Molhamento de solo com MeJA diminuiu em 50% a invasão de nematoides em raízes de aveia, quando comparado com plantas não tratadas (SORIANO et al., 2004b). Adicionalmente, o fato de não ter sido observado efeito dos tratamentos com cJ neste trabalho pode ser atribuído ao reduzido número de repetições e à grande vulnerabilidade nas populações de

nematoides, que podem ser influenciadas por fatores como temperatura, umidade, condições de armazenamento do inóculo. Assim sendo, experimentos adicionais são necessários para a elucidação do efeito de CJ na reprodução de *M. javanica*.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem sugerir que:

1. a aplicação foliar de *cis*-jasmone induz sistemicamente compostos de defesa em raízes de soja, principalmente no genótipo resistente;
2. a indução local, com molhamento de solo com *cis*-jasmone, tende à inibição da síntese de compostos de defesa;
3. a fitoalexina coumestrol é um dos compostos relacionados à resistência da soja à *M. javanica*; e
4. aplicação de *cis*-Jasmone, tanto foliar como no molhamento do solo, nas concentrações utilizadas, não afetam a reprodução dos nematoides.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, P.A.; GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Effects of soybean genotypes on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.59, p.95-105, 2001.
- AUBERTOT, J.N.; WEST, J.S.; BOUSSET-VASLIN, L.; SALAM, M.U.; BARBETTI, M.J.; DIGGLE, A.J. Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). **Eur. J. Plant Pathol.**, v.114, p.91-106, 2006.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4 ed. San Diego: Academic, 1997.
- ATKINSON, H.J. Plant-nematode interactions: molecular and genetics basis: **In: Kohmoto, k.; Singh, R.P. Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Elsevier Science Ltda., v.2, p.355-369, 1995.
- BALDRIDGE, G.D.; O'NEILL, N.R.; SAMAC, D.A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: Defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. **Plant Mol. Biol.**, v.38, p.999-1010, 1998.
- BALDWIN, I.T.; SCHMELZ, E.A.; OHNMEISS, T.E. Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini and Comes. **Journal Chemical Ecology**, v.20, p.2139-2157, 1994.
- BARKER, K.R. Introduction. **In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, p.1-20, 1998.
- BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. New roles for *cis*-jasmones as an insect semiochemical and in plant defense. **Plant Biology**, v.97, n.16, p.9329-9334, 2000.
- BOWLES, D.J.; GURR, S.; ATKINSON, H.J.; HAMMOND-KOSAK, H. Local and systemic changes in plant gene expression. **In: Smith, C.J. (ed.) Biochemistry and molecular biology of plant-pathogen interactions**. Oxford: University Press, p. 225-239. 1991.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

- BRUCE, T.J.A.; MARTIN, J.L.; PICKETT, J.A.,PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J. *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). **Pest Manag Sci**, v.59, p.1031-1036, 2003.
- CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; BARBEOCH, L.P.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.104-11, 2008.
- CAMPOS-VARGAS, R. & SALTVEIT, M.E. Involvement of chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.73-84, 2002.
- CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SOUZA, A. Association of isoflavonoids with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita* race 3. **Nematropica**, v.35, p.103-110, 2005.
- CAVALCANTI, I.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, SP. ed. FEALQ, v.13, 2005. 263p.
- CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\\_09.12.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf). Acessado dia 19/11/2011.
- COOPER, W.R.; JIA, L.; GOGGIN, L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, v.31, n.9, p.1953-1967, 2005.
- DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; BAUM T.J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitol**, v.20, n.3, p.134-141, 2004.
- DEWICK, P. M. Isoflavonoids. In: HARBONE, J.B. **The flavonoids. Advances in research since 1986**. London, Chapman & Hall, p.117, 1994. 676p.
- DHAUBHADEL, S.; MCGARVEY, B.D.; WILLIAMS, R. & GIJZEN, M. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. **Plant Molecular Biology**, v.53, n.6, p.733-743, 2003.
- DIXON R.A. & PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085–1097, 1995.
- EDENS, R.M.; ANAND, S.C.; BOLLA, R.I. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.27, n.3, p.292-303, 1995.

- EMBRAPA 2010. **Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 20p. (Circular Técnica, 74).
- FARAG, M.A. & PARÉ, P.W. C6-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emission in tomato. **Phytochemistry**, v.61, p.545-554, 2002.
- FERRARESE, M.L.L.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. **Plant Biology**, v.2, p.152-153, 2000.
- FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In. SILVA, J.F.V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R.G.; ASMUS, G.L. & FERRAZ, L.C.C.B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.
- GHEYSEN, G. & FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.191-219, 2002.
- GIEBEL, J. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activities in potato roots and their significance in potato resistance to *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica**, v.19, p.1-6, 1973.
- GRAHAM, T. L. & GRAHAM, M. Y. Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. **Physio. and Mol. Plant Path.**, v.55, p.13-20, 1999.
- GRAHAM, T.L. & GRAHAM, M.Y. Signaling in soybean phenylpropanoid response: dissection of primary, secondary and conditioning effects of light, wounding and elicitor treatment. **Plant Physiology**, p.110, v.1123-1133, 1996.
- GRAHAM, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v.95, p.594-603, 1991.
- GRAHAM, T.L. & GRAHAM, M.Y. Gliceolin elicitors induced major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean cell populations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, p.60-68, 1991.
- GRAHAM, T. L.; KIM, J. E.; GRAHAM, M. Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Mol. Plant-microb. Interact.**, v.3, p.157-166, 1990.

- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS-NETO, J.A.; OLIVEIRA, M.C.N.; JACOB-OLIVEIRA, L. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.10, p.1453-1459, 2006.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soyabean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hubner)**, 1995. 165p. PHD. Thesis, The University of Reading, United Kingdom.
- HORBOWICZ, M.; MIODUSZEWSKA, H.; KOCZKODAJ, D.; SANIEWSKI, M. The effect of *cis*-jasmonone, acid jasmonic and methyl jasmonate on accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.78, n.4, p.271-277, 2009.
- HUANG, J.S. & BARKER, R. Spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. **Plant Physiol.**, v.96, p.1302, 1991.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.H. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Dis. Rep.**, v.57, p.1025-1028, 1973.
- JIN, P.; ZHENG, Y.; TANG, S.; RUI, H.; Wang, C.Y. A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.52, p.24-29, 2009.
- KAPLAN, D.T.; KEEN, N.T. and THOMASON, I.J. Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, v.16, p.309-318, 1980.
- KESSLER, A. & BALDWIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.299-328, 2002.
- KIMATI H.; AMORIM L.; REZENDE J.A.M.; BERGAMIN FILHO A.; CAMARGO L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, editora Ceres, v.2, p.576, 2005.
- KOCH, T.; KRUMM, T.; JUNG, V.; ENGELBERTH, J.; BOLAND, W. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadenoid-signaling pathway. **Plant Physiology**, v.121, p.153-162, 1999.
- KOCH, T.; BANDERMER, K.; BOLAND, W. Biosynthesis of *cis*-jasmonone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? **Helvetica Chimica Acta**, v.80, p.838-850, 1997.
- KORTH, K.L. & THOMPSON, G.A. Chemical signals in plants: jasmonates and the role of insect-derived elicitors in responses to herbivores. **In:**

- TUZUN, S.; Bent, E. (Ed). Multigenic and induced systemic resistance in plants.** New York: Springer. p.259-278, 2006.
- KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BACKOR, M.; REPCAČ, M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. **Plant Sci.**, v.172, p.393-399, 2007.
- LANDINI, S.; GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Lactofen induces isoflavone accumulation and glyceollin elicitation competency in soybean. **Phytochemistry**, v.62, p.865-874, 2003.
- LYGIN, A.V.; LI, S.; VITTAL, R.; WIDHOLM, J.M.; HARTMAN, G.L.; LOZOVAYA V.V. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v.99, n.12, p.1412-1420, 2009.
- LUI, S.; NORRIS, D.M.; HARTWIG, E.E.; XU, M. Inducible phytoalexins in juvenile soybeans genotypes predict soybean looper resistance in the fully developed plants. **Plant Physiology**, v.100, p.1479-1485, 1992.
- MA, J. & ZHAO, Y. Effect of exogenous methyl jasmonate on pathway of isoflavone synthesis in soybean. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.5, p.14-18, 2011.
- MAHAJAN, R.; KAUR, D.J. and BAJAJ, K.L. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Nematol. Medit.**, v.20, p.217-219, 1992.
- MORAES, M.C.B.; BIRKETT, M.A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L.E.; MARTIN, J.L.; PYE, B.J.; BROMILOW, R.; PICKETT, J.A. *cis*-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, v.69, p.9-17, 2008.
- MARTIN, F.N. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.41, p.325-350, 2003.
- OJIMA, A.L.R. de O. & YAMAKAMI, A. Analysis of the logistical movement and competitiveness of soybean in the Brazilian Center-North region: an application of a spatial equilibrium model with quadratic programming. **In: IV International conference on agri-food chain/networks economics and management**, 2003, Riberão Preto. Anais... Riberão Preto: USP, 2003.
- PARK, D.S.; LANDINI, S.; GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Induced distal defence potentiation against *Phytophthora sojae* in soybean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.293-310, 2002.



- PICKETT, J.A. & POPPY, G.M. Switching on plant genes by external chemical signals. **Trends in Plants Sciences**, v.6, p.137-139, 2001.
- PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; ARRUDA, I.C.; FRANCHINI, J.C.; LARA, F.M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.5, p.1223-1233, 2003.
- RAYAPURAM, C. & BALDWIN, I.T. Increased AS in NPR1-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. **The Plant Journal**, v.52, p.700-715, 2007.
- REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B.J.R.; VINCENT, C. **Biopesticides d'origine végétale**. Tec et Doc, Paris (FRA), 2002.
- RICH, J.R.; KEEN, N.T.; THOMASON, I.J. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Protylechus scribneri*. **Physiology Plant Pathology**, v.10, p.105-116, 1977.
- SALGADO, S.M.L. & SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. IN: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). FEALQ, Piracicaba, SP, v.13, p.155-168, 2005.
- SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.
- SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. Phytoecdysteroids: A novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.1885-1899, 2004a.
- SORIANO, I.R.; ASENSTORFER, R.E.; SCHMIDT, O.; RILEY, I.T. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Phytopathology**, v.94, p.1207-1214, 2004b.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N.; NELSON. **Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of Meloidogyne species in agricultural soils**. North Carolina State University/United States Agency for International Development, Raleigh, USA. 1982.
- THALER, J.S.; FIDANTSEF, A.L.; BOSTOCK, R.M. Antagonism between jasmonate-and-salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, n.6, p.1131-1159, 2002.

- THALER, J.S.; STOUT, M.J.; KARBAN, R.; DUFFEY, S.S. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Jornal of chemical Ecology**, v.22, p.1767-1781, 1996.
- Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2011**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, p.197-224, 2010. 255 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 14).
- Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2005**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 239 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção).
- TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **Plant Cell**, v.14, p.153-64, 2002.
- VEECH, J.A. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. **Journal of Nematology**, v.14, n.1, p.2-9, 1982.
- WALTERS D., COWLEY T., and MITCHELL A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.747-756, 2002.
- WESTERNACK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annual Bot.**, v.100, p.681-697, 2007.
- WILLIAMS, C.A. & HARBORNE, J.B. Isoflavonoids, In: **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press Limited, 1989.
- WILLIAMSON, V.M. & GLEASON, C.A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.4, p.327-333, 2003.
- XU, B.; ZHEN, H.; LU, Q.; ZHAO, S. **Three new evidences of the original area of soybean**. In: World Soybean Research Conference, 4, Buenos Aires, 1989. Proceedings. Buenos Aires: Gráfica Editora SRL, p.124-128, 1989.
- YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes & Dev.**, v.11, p.1621-1639, 1997.
- YU, O. and MCGONIGLE, B. Metabolic engineering of isoflavone in soybean seed. **Phytochemistry**, v.63, p.753-763, 2005.
- ZHANG, Z.P. & BALDWIN, I.T. Transporte f [2-C-14] jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, v.203, p.436-441, 1997.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A. A., SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistema de Análise Estatística - SANEST**, Registro na SEI No. 066060, UFPEL, Pelotas, 1982. 63p.

## APÉNDICE

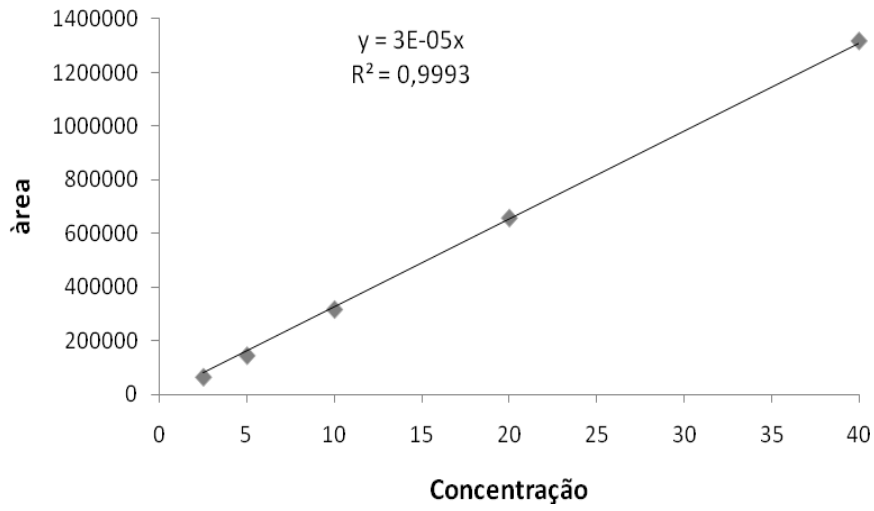


Figura 1A. Curva padrão do ácido cinâmico para determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase.

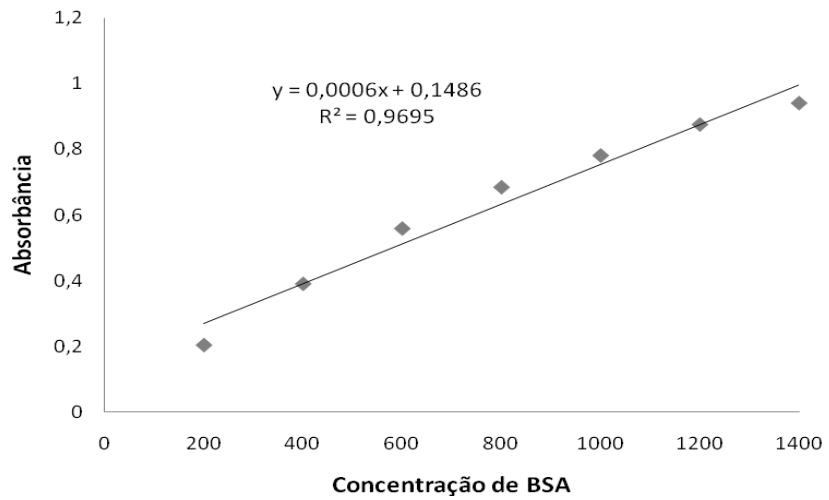


Figura 2A. Curva padrão da albumina bovina para determinação de proteína.

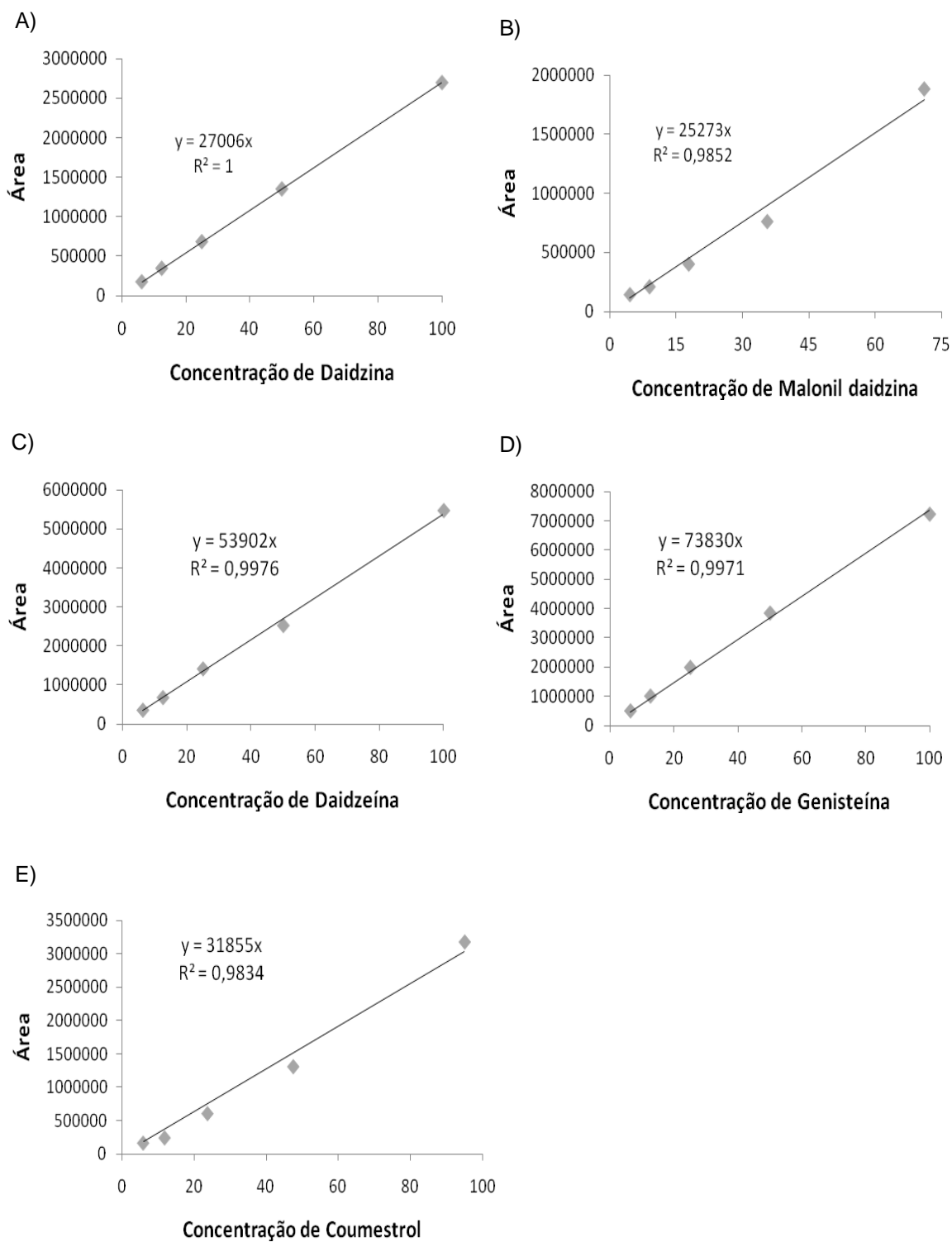


Figura 3A. Curvas dos padrões de isoflavonoides daidzina (A), malonil daidzina (B), daidzeína (C), genisteína (D) e coumestrol (E).