

KELLY JULIANE TELLES NASCIMENTO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM  
PLANTAS DE SOJA SUPRIDAS COM SILÍCIO E  
INFECTADAS POR *Cercospora sojina***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N244a  
2013  
Nascimento, Kelly Juliane Telles, 1983-  
Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de soja  
supridas com silício e infectadas por *Cercospora sojina* / Kelly  
Juliane Telles Nascimento. – Viçosa, MG, 2013.  
x, 106f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fisiologia vegetal. 2. Soja. 3. Stress oxidativo.  
4. Fotossíntese. 5. Mancha-olho-de-rã. 6. Silício.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.  
II. Título.

CDD 22 ed. 571.2

KELLY JULIANE TELLES NASCIMENTO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM  
PLANTAS DE SOJA SUPRIDAS COM SILÍCIO E  
INFECTADAS POR *Cercospora sojina* K. Hara**

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

Aprovada: 17 de junho de 2013.

---

Fábio Murilo da Matta  
(Coorientador)

---

Leandro José Dallagnol

---

Paulo Cezar Cavatte

---

Wagner Luiz Araújo

---

Fabricio de Ávila Rodrigues  
(Orientador)

*“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.*

*Isaac Newton*

*Aos meus amados pais Augustinha Telles e  
Márcio Santos, aos meus irmãos Cristiane,  
Gustavo e Wmarley, aos meus sobrinhos  
Daniel, Dayane e Felipe Gabriel e com  
carinho ao Daniel Debona:*

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente ao meu grandioso Deus por mais essa conquista.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de doutorado concedida (Processo 142342/2009-2).

À Universidade Federal de Viçosa, aos Departamentos de Biologia Vegetal e Fitopatologia e aos Programas de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e Fitopatologia por me proporcionarem condições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Orientador e amigo Fabricio de Ávila Rodrigues pela amizade e compreensão nos momentos de dificuldades, além da orientação e apoio incondicional na execução deste trabalho.

Ao Professor Fábio Murilo da Matta, com eterna admiração, pelos ensinamentos e sugestões que contribuíram sobremaneira para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Tuneo Sedyama e ao amigo José Cupertino (Departamento de Fitotecnia da UFV) pelo fornecimento das sementes de soja das cultivares Bossier e Conquista e do isolado de *Cercospora sojina* (UFV-22) utilizados neste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal que contribuíram para o meu aprendizado e formação profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em especial ao Samuel e ao Paulo pela ajuda nas análises fisiológicas e bioquímicas.

A todos os amigos do Laboratório da Interação Planta-Patógeno pela amizade e apoio na execução dos trabalhos.

Ao Daniel Debona, pela ajuda incondicional em todas as etapas desse trabalho e, sobretudo, pela convivência maravilhosa.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal e Fitopatologia: Carlos, Mercês, Luciene, Braz, Bruno, Camilo, Sara, Nize e Suely.

As amigas de república Camila, Laís, Thaís, Júlia, Flávia e Karol pelos momentos de descontração e carinho.

A todos os meus amigos, em especial ao Ricardo Rates, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos que estive em Viçosa e, sobretudo, pelo carinho.

A todos da minha família que sempre estiveram torcendo por mim, em especial a minha tia Luzia pelas orações.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Kelly Juliane Telles Nascimento, filha de Rafael Arcanjo do Nascimento Neto e Augustinha Telles Ferreira Santos, nasceu no dia 09 de novembro de 1983, em Rio Verde, Goiás.

Em agosto de 2005, graduou-se em Biologia pela Universidade de Rio Verde (FESURV). Neste mesmo ano, iniciou o curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Juraci Alves de Oliveira, defendendo a sua dissertação em 2007.

No ano de 2008 trabalhou como estagiária do Laboratório da Interação Planta-Patógeno auxiliando alunos de pós-graduação em análises bioquímicas.

Em agosto de 2009, ingressou no curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal Viçosa, sob orientação do Prof. Fabricio de Ávila Rodrigues, defendendo a tese em junho de 2013.

**SUMÁRIO**

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	xii
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	xiv
<i>Capítulo 1: Alterações no sistema antioxidativo em plantas de soja supridas com silício e infectadas por Cercospora sojina</i> .....	1
RESUMO .....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
Preparo da solução nutritiva .....	5
Crescimento das plantas.....	5
Preparo do inóculo .....	5
Procedimento de inoculação das plantas.....	5
Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si .....	6
Avaliações bioquímicas .....	6
Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	7
RESULTADOS .....	8
Concentração foliar de Si.....	8
Severidade da mancha olho de rã.....	8
Variáveis bioquímicas.....	8
DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
TABELAS E FIGURAS.....	23
<i>Capítulo 2: Limitações fisiológicas em plantas de soja supridas com silício e infectadas por Cercospora sojina</i> .....	36
RESUMO .....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
Preparo da solução nutritiva .....	40
Crescimento das plantas.....	40
Preparo do inóculo .....	40
Procedimento de inoculação das plantas.....	41
Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si .....	41
Determinação das trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	41
Determinação das concentrações de clorofilas e carotenoides .....	42
Determinação da concentração de carboidratos.....	42
Avaliação das imagens de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	42
Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	43
RESULTADOS .....	44
Concentração foliar de Si.....	44
Severidade da mancha olho de rã.....	44
Trocas gasosas, fluorescência da clorofila <i>a</i> e concentração de carboidratos.....	44
Concentração de clorofilas e carotenoides.....	45
Imagens de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	46
Correlação de Pearson. ....	46
DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

TABELAS E FIGURAS.....	57
<i>Capítulo 3: Mecanismo de defesa e atividade de hidrolases da parede celular em plantas de soja supridas com silício e infectadas por <i>Cercospora sojina</i></i> .....	71
RESUMO .....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	75
Preparo da solução nutritiva .....	75
Crescimento das plantas.....	75
Preparo do inóculo .....	75
Procedimento de inoculação das plantas.....	76
Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si .....	76
Avaliações bioquímicas .....	76
Determinação da atividade de enzimas lipoxigenase, felilalanina-amônia-liase, $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase e polifenoxidase.....	76
Determinação da atividade de enzimas celulase, xilanase, pectina metil esterase e poligalacturonase .....	78
Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais e derivados da lignina-ácido tioglicólico .....	79
Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	80
RESULTADOS .....	81
Concentração foliar de Si.....	81
Severidade da mancha olho de rã.....	81
Variáveis bioquímicas.....	81
DISCUSSÃO .....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
TABELAS E FIGURAS.....	93
CONCLUSÕES GERAIS .....	103

## RESUMO

NASCIMENTO, Kelly Juliane Telles, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2013. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de soja supridas com silício e infectadas por *Cercospora sojina***. Orientador: Fabricio de Ávila Rodrigues, Coorientador: Fábio Murilo da Matta.

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das principais doenças foliares da soja, pois pode acarretar grandes perdas na produtividade dessa cultura, o que se deve principalmente à acentuada redução da área fotossinteticamente ativa pela ação de toxinas não seletivas. Diversos estudos têm demonstrado que o silício (Si) potencializa a resistência de plantas a diversas doenças fúngicas através de diferentes mecanismos, entre eles o aumento da eficiência do sistema antioxidativo, aumento na atividade de enzimas de defesa contra patógenos, além de propiciar redução na limitação fisiológica imposta pela infecção por patógenos. Com base nessas informações, neste estudo avaliamos o efeito do Si no controle da mancha olho de rã, no sistema antioxidativo, na concentração de espécies reativas de oxigênio e nos danos celulares decorrentes do processo infeccioso de *C. sojina*. Nós também avaliamos o efeito do Si nas trocas gasosas, nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, nas concentrações de pigmentos cloroplastídicos, das hexoses (glicose e frutose), sacarose e amido. Além disso, foi avaliado o efeito do Si sobre a atividade de enzimas de defesa e na concentração de fenóis e lignina, além da importância de algumas enzimas de degradação da parede celular (EDPC) vegetal para o processo infeccioso de *C. sojina*, bem como o efeito do Si sobre a atividade dessas enzimas. Plantas de soja das cvs. Bossier e Conquista, suscetível e resistente à mancha olho de rã, respectivamente, foram crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de Si (-Si e + Si, respectivamente) e inoculadas ou não com *C. sojina*. Neste estudo, nós observamos que a severidade da mancha olho de rã foi maior para a cv. Bossier do que para a cv. Conquista, independente do suprimento com Si. Para ambas as cultivares, a severidade foi maior para as plantas supridas com Si do que para as plantas não supridas com esse elemento, porém de forma mais proeminente para a cv. Bossier. As plantas de ambas as cultivares inoculadas com *C. sojina* apresentaram, de modo geral, incremento no sistema antioxidativo tanto enzimático quanto não enzimático em relação às plantas não inoculadas, independente do suprimento com Si. Na ausência de inoculação, a atividade da maioria das enzimas foi menor para as plantas supridas com Si do que para as não supridas. No final do processo infeccioso, plantas inoculadas da cultivar Bossier supridas com Si apresentaram aumento na atividade da maioria das enzimas antioxidativas em relação às plantas não supridas com Si e maiores

concentrações de  $O_2^-$  e MDA, indicando maior estresse oxidativo naquelas plantas. Adicionalmente, na ausência da inoculação com *C. sojina*, o Si não acarretou mudanças fisiológicas nem na concentração de carboidratos. Todavia, esse elemento desencadeou aumento na suscetibilidade de plantas de soja à mancha olho de rã, resultando em decréscimo mais pronunciado das trocas gasosas e na eficiência fotoquímica, bem como na concentração de pigmentos cloroplastídicos para a cv. Bossier. Para a cv. Conquista, o efeito negativo da infecção por *C. sojina* sobre a fisiologia das plantas foi associado fundamentalmente à redução em  $g_s$ , independente do suprimento com Si. Além disso, a inoculação com *C. sojina* desencadeou, de modo geral, aumento nas hexoses para as duas cultivares e níveis de Si, evidenciando que o incremento dessas moléculas pode ser uma estratégia de defesa das plantas de soja contra *C. sojina*. Nas plantas não inoculadas, o suprimento com Si não alterou a atividade de enzimas de defesa e de EDPC nem as concentrações de fenóis solúveis totais e de lignina, independente da cultivar. Entretanto, o Si, de modo geral, resultou em menores atividades das enzimas lipoxigenase, felilalanina-amônia-liase, quitinase, peroxidase inespecífica e polifenoloxidase, além de aumento na atividade de EDPC em plantas de soja infectadas por *C. sojina*. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem as primeiras evidências de que o Si reduz a atividade basal de enzimas do sistema antioxidativo de plantas de soja aumentando a suscetibilidade da soja à mancha olho de rã e os danos celulares decorrentes da infecção por *C. sojina*. Em adição, foi evidenciado neste estudo que o suprimento de plantas de soja com Si potencializou menores atividades de enzimas de defesa contra *C. sojina* e também favoreceu o processo infeccioso desse fungo mediante aumento da atividade de enzimas líticas da parede celular, levando à menor resistência contra *C. sojina* tanto para a cultivar resistente quanto para a suscetível, porém de forma mais pronunciada para essa última.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Kelly Juliane Telles, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June 2013. **Physiological and biochemical changes in soybean plants supplied with silicon and infected by *Cercospora sojina***. Orientador: Fabricio de Ávila Rodrigues, Coorientador: Fábio Murilo da Matta.

The frogeye spot, caused by the fungus *Cercospora sojina*, is one of the most important foliar diseases of soybean because it can result in large yield losses, mainly due to the sharp reduction in photosynthetically active area by the action of non-selective toxins. Several studies have shown that silicon (Si) enhances the resistance of plants to fungal diseases through different mechanisms, including increased efficiency of the antioxidant system, increased activity of enzymes of defense against pathogens, in addition to providing reduction in physiological limitation imposed by pathogen infection. Therefore, it was evaluated the effect of Si in controlling the frogeye spot, in the antioxidative system, concentration of reactive oxygen species and cellular damage resulting from infection process of *C. sojina*. In addition, the effect of Si in gas exchange, the parameters of chlorophyll *a* fluorescence in chloroplastid pigment, the hexoses (glucose and fructose), sucrose and starch. Furthermore, it was evaluated the effect of Si on the activity of defense enzymes and concentration of phenolics and lignin besides the importance of some cell wall degrading enzymes (CWDE) for the process plant infectious *C. sojina* as well as the effect of Si on the activity of these enzymes. Soybean plants of cvs. Bossier and Conquista, susceptible and resistant to frogeye spot, respectively, were grown in nutrient solution containing 0 or 2 mM Si (-Si and Si +, respectively) and inoculated or not with *C. sojina*. In this study, the frogeye spot severity was higher for cv. Bossier than for cv. Conquista, regardless of Si supply. For both cultivars, the severity was higher for plants supplied with Si than for plants not supplied with this element, but more prominent for the cv. Bossier. Soybean plants inoculated with *C. sojina* of both cultivars showed, in general, an increase in antioxidant system both enzymatic and non-enzymatic compared to non-inoculated plants, regardless of supply Si. In the absence of inoculation, the activities of the most enzymes was lower for plants supplied with Si than for those not supplied. Soybean plants inoculated with *C. sojina* of both cultivars showed, in general, increase in both enzymatic and non-enzymatic antioxidative system in relation to non-inoculated ones, regardless of Si supply. At the end of the infection process, inoculated plants from cv. Bossier supplied with Si showed an increase in the activity of most antioxidant enzymes in relation to plants not supplied with Si and higher concentrations of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and MDA, indicating increased

oxidative stress in those plants. In the absence of inoculation with *C. sojina*, Si neither caused physiological changes nor in the concentration of carbohydrates. However, this element increased the susceptibility of soybean to frogeye spot, resulting in more pronounced decrease of gas exchange and photochemical efficiency, as well as in the concentration of pigments chloroplastid for cv. Bossier regarding cv. Conquista. For cv. Conquista, the negative effect of *C. sojina* infection on the plant physiology was primarily associated with the reduction in  $g_s$ , regardless of Si supply. Moreover, inoculation with *C. sojina* triggered, in general, increase in hexoses for both cultivars and levels of Si, indicating that the increase of these molecules may be a defense strategy of soybean plants against *C. sojina*. The Si supply Si did not alter the activity of defense enzymes and CWDE neither the concentration of total soluble phenolics and lignin in non-inoculated plants, regardless of the cultivar. However, Si generally resulted in lower activity of lipoxygenase, felilalanina-ammonia-lyase, chitinase, nonspecific peroxidase and polyphenoloxidase, and increased activity of CWDE in soybean plants infected by *C. sojina*. The results of this study provide the first evidence that Si reduces the basal activity of antioxidant enzymes system of soybean plants increasing the susceptibility of soybean to frogeye spot and the cellular damage resulting from infection by *C. sojina*. In addition, is was evidenced this study indicate that the Si supply of soybean plants potentiated lower activities of defense enzymes against pathogens and also favored the infectious process of *C. sojina* by increasing the activity of cell wall lytic enzymes, leading to less resistance against *C. sojina* both for the resistant and susceptible cultivars, but more pronounced for the latter.

## INTRODUÇÃO GERAL

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das doenças foliares mais importantes da cultura da soja, podendo ocorrer também em sementes, legumes e hastes (Mian *et al.*, 1998). Danos causados por essa doença têm sido na ordem de 10 a 60% (Mian *et al.*, 1998) devido principalmente à redução da área fotossinteticamente ativa, através da formação de inúmeras lesões necróticas com halos cloróticos mediada pela ação de toxinas produzidas por *C. sojina*, além da intensa desfolha prematura (Mian *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Recentemente, foram registradas epidemias da mancha olho de rã em algumas regiões produtoras de soja, como a Argentina e sul dos Estados Unidos (Reis *et al.*, 2012; Zhang, 2012). No Brasil, a ocorrência da mancha olho de rã foi registrada nas duas últimas safras em várias lavouras do Rio Grande do Sul (Reis *et al.*, 2012), o que indica que novas epidemias possam ocorrer no Brasil. A aplicação de fungicidas associado ao uso de cultivares com certo nível de resistência (Missaoui *et al.*, 2007) são as principais medidas de controle adotadas pelos países produtores de soja para o controle da doença. Porém, Zhang *et al.* (2012) reportaram a redução na sensibilidade de determinados isolados de *C. sojina* ao tratamento com fungicidas. Portanto, além da utilização de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas, a busca de novos métodos alternativos de manejo da mancha olho de rã devem ser investigados para o controle efetivo dessa doença.

Dentre os vários elementos minerais, o silício (Si) tem um papel importante no aumento da resistência de plantas ao ataque por patógenos (Datnoff *et al.*, 2007; Dallagnol *et al.*, 2013). Esse elemento é o segundo mineral mais abundante da crosta terrestre, e os seus óxidos compreendem cerca de 50-60% da massa do solo, e em função de sua abundância é esperado que todas as plantas apresentem alguma quantidade de Si em seus tecidos (Ma e Yamaji, 2006). Embora os mecanismos de resistência de plantas a doenças potencializados pelo Si precisam ser mais bem elucidados, existem evidências do seu envolvimento na potencialização de mecanismos fisiológicos e bioquímicos em plantas infectadas por patógenos. Mohaghegh *et al.* (2011), por exemplo, relataram que o acréscimo de Si na solução propiciou um sistema antioxidativo mais eficiente às plantas de pepineiro infectadas por *Phytophthora melonis* e, conseqüentemente, maior integridade das membranas celulares comparadas às plantas não supridas com esse elemento. Além disso, Rodrigues *et al.* (2005) reportaram que plantas de arroz inoculadas com *Pyricularia grisea* e supridas com Si apresentaram menor severidade da brusone quando comparadas com as crescidas sem a

adição de Si no meio de cultivo. Esses autores atribuíram a maior resistência das plantas à síntese de fitoalexinas da classe de diterpenóides potencializada pelo Si (Rodrigues *et al.*, 2005). Recentemente, Dallagnol *et al.* (2013) demonstraram que o aumento na concentração foliar de Si em plantas de arroz infectadas por *Bipolaris oryzae* resulta em menor comprometimento na taxa fotossintética e maior concentração de hexoses. Além disso, Gao *et al.* (2011) reportaram que o Si potencializou menor decréscimo da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) em plantas de arroz infectadas por *Magnaporthe oryzae*. Portanto, investigar a utilização do Si na potencialização da resistência da soja à mancha olho de rã, mediante a elucidação dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos, poderá ser promissor para o controle efetivo da mancha olho de rã.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Dallagnol LJ, Rodrigues AF, Chaves ARM, Vale FXR, DaMatta FM. (2013) Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicon uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* 62: 120-129.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold K. (2007) Silicon and Plant Disease. In: Mineral Nutrition and Plant Disease, (pp. 233-246). Eds LE Datnoff, WE Elmer and DM Huber. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Gao D, Cai K, Chen J, Luo S, Zeng R, Yang J, ZX. (2011) Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in Magnaporthe oryzae infected rice plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 675-682.
- Kim J-S, Lee Y-S, Kim S-K, Kim KD, Kim J-W. (2011) Differential responses of soybean cultivars to *Cercospora sojina* isolates, the causal agent of frogeye leaf spot in Korea. *The Plant Pathology Journal* 27: 183-186.
- Ma JF, Yamaji N. (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Plant Science* 11: 1-6.
- Mian MAR, Boerma HR, Phillips DV, Kenty MM, Shannon G, Shipe ER, Soffes AR, Weaver DB. (1998) Performance of frogeye leaf spot resistant and susceptible near isolines of soybean. *Plant Disease* 82: 1017-1021.
- Mian MAR, Missaoui AM, Walker DR, Phillips DV, Boerma HR. (2008) Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science* 48: 14-24.
- Missaoui A.M, HA BK, Phillips DV, Boerma HR. (2007) Single nucleotide polymorphism detection of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science* 47: 1681-1690.
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh AH, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N. (2011) Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in Cucumber. *Plant Disease* 95: 455-460.
- Reis EM, Danelli ALD, Casa RT. (2012) Ciclo da mancha foliar olho-de-rã, na soja. *Revista Plantio Direto*, edição 132, novembro/dezembro.
- Rodrigues FA, Datnoff LE. (2005) Silicon and rice disease management. *Fitopatologia Brasileira* 30: 457-469.
- Zhang G. (2012) *Cercospora sojina*: over-winter survival and fungicide resistance. Urbana, Illinois, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dissertation.

## *Capítulo 1*

**Alterações no sistema antioxidativo em plantas de soja supridas com silício e infectadas por *Cercospora sojina***

## RESUMO

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das principais doenças foliares da cultura da soja, acarretando redução na produtividade entre 10 e 60%. Diversos estudos têm demonstrado que o silício (Si) potencializa a resistência de plantas a diversas doenças através de diferentes mecanismos, entre eles o aumento da eficiência do sistema antioxidativo. Portanto, neste estudo foi avaliado o efeito do Si no controle da mancha olho de rã, no sistema antioxidativo, na concentração de espécies reativas de oxigênio e nos danos celulares decorrentes do processo infeccioso de *C. sojina* em plantas de soja das cultivares Bossier e Conquista, suscetível e resistente à mancha olho de rã, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que a severidade da mancha olho de rã foi maior nas plantas da cultivar Bossier do que nas plantas da cultivar Conquista, independentemente do suprimento com Si. Para ambas as cultivares, os valores de severidade foram maiores para as plantas supridas com Si do que para as plantas não supridas com esse elemento. Na ausência de inoculação, a atividade da maioria das enzimas foi menor para as plantas supridas com Si do que para as não supridas. Plantas de soja inoculadas com *C. sojina* de ambas as cultivares apresentaram, de modo geral, incremento no sistema antioxidativo tanto enzimático quanto não enzimático em relação às plantas não inoculadas, independentemente do suprimento com Si. No final do processo infeccioso, plantas inoculadas da cultivar Bossier supridas com Si apresentaram aumento na atividade da maioria das enzimas em relação às plantas não supridas com Si e maiores concentrações de  $O_2^-$  e MDA, indicando maior estresse oxidativo naquelas plantas. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem as primeiras evidências de que o Si reduz a atividade basal de enzimas do sistema antioxidativo de plantas de soja aumentando a suscetibilidade da soja à mancha olho de rã e os danos celulares decorrentes da infecção por *C. sojina*.

*Palavras chave:* mancha olho de rã, sistema antioxidativo, *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina* K. Hara, é uma das principais doenças foliares da cultura da soja, ocorrendo com maior intensidade após o florescimento das plantas (Lucena *et al.*, 1982). Essa doença é favorecida por condições de alta temperatura e elevada umidade (Mian *et al.*, 2008). Os sintomas da mancha olho de rã iniciam-se nas folhas como pequenas manchas de aspecto encharcado (anasarca). Com o progresso da doença, as lesões apresentam centro de coloração castanho-clara e bordos castanho-avermelhados na superfície adaxial (Almeida *et al.*, 2005a). Na face abaxial, as lesões são de coloração cinza, e ocorre abundante esporulação do fungo (Almeida *et al.*, 2005a). Nas hastes e nos legumes, os sintomas iniciam-se na forma de anasarca, evoluindo para manchas circulares de cor castanho-escura (Almeida *et al.*, 2005a). O tegumento das sementes infectadas por *C. sojina* apresenta rachaduras e manchas de tamanhos variáveis de coloração parda a cinza (Almeida *et al.*, 2005a). Quando numerosas infecções ocorrem, as lesões coalescem, adquirindo formato irregular (Almeida *et al.*, 2005a).

Danos na produtividade entre 10 e 60% têm sido relatados devido à mancha olho de rã (Mian *et al.*, 1998). Essa redução decorre da diminuição da área foliar fotossinteticamente ativa pelas lesões necróticas e também pela desfolha prematura (Mian *et al.*, 2008). A secreção de enzimas líticas e toxinas não específicas, como a cercosporina, por *Cercospora* spp. resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Daub, 1982b, Daub e Ehrenshaft, 2000; Gnanamangai *et al.*, 2011). Dentre as EROs, destacam-se o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) (Trachootham *et al.*, 2008), que, por serem fortes agentes oxidantes, podem causar oxidação de macromoléculas essenciais, como lipídeos de membranas, pigmentos, ácidos nucleicos e proteínas (Apel e Hirt, 2004), causando senescência precoce (Baker e Orlandi, 1995). Para conter os efeitos deletérios das EROs, as plantas evoluíram um complexo sistema antioxidativo, o qual inclui uma ampla gama de compostos, por exemplo o ácido ascórbico e a glutathione reduzida (GSH) (Noctor *et al.*, 2012), além de enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathione (GR), peroxidases inespecíficas (POX) (Alscher *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Magbanua *et al.*, 2007), peroxidase da glutathione (GPX) e glutathione-S-transferase (GST) (Wagner *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2009; Noctor *et al.*, 2012).

Embora o silício (Si) não seja considerado um elemento essencial para as plantas superiores (Epstein, 1994), é amplamente reconhecido que esse elemento é benéfico para a defesa de plantas contra estresses de natureza biótica e abiótica (Gunes *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Mohaghegh *et al.*, 2011; Dallagnol *et al.*, 2011; Lemes *et*

*al.*, 2011; Van Bockhaven *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado que o Si aumenta a tolerância de plantas submetidas a diversos estresses por reduzir o dano oxidativo, mediante incremento da eficiência do sistema antioxidativo (Liang *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). Mohaghegh *et al.* (2011) demonstraram que a concentração de compostos antioxidativos contendo grupos sulfidrílicos e a atividade das enzimas CAT e APX em plantas de pepineiro infectadas por *Phytophthora melonis* foram aumentadas pelo suprimento com Si. Além disso, o aumento na resistência de plantas ao estresse oxidativo acarretado por patógenos potencializado pelo Si pode estar relacionado com sua deposição na parede celular e aumento na estabilidade dos componentes da membrana plasmática (Mohaghegh *et al.*, 2011). Em adição, o Si aumenta a defesa de plantas contra patógenos pela potencialização de reações bioquímicas, incluindo a lignificação, síntese de compostos fenólicos, de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Rodrigues *et al.*, 2003, 2004, 2005; Xavier Filha *et al.*, 2011), além de aumento na atividade das enzimas aconitase e metil aconitase (Rémus-Borel *et al.*, 2009).

A mancha olho de rã tem sido controlada pelo uso de cultivares com resistência vertical a *C. sojina* (Missaoui *et al.*, 2007), porém novas epidemias podem ocorrer devido à elevada variabilidade genética do fungo (Almeida *et al.*, 2005b). Assim, métodos alternativos de manejo da doença devem ser investigados. Considerando-se que o Si tem controlado inúmeras doenças de plantas, entre elas a ferrugem da soja (Pereira *et al.*, 2009; Lemes *et al.*, 2011), além de seu efeito no aumento da eficiência do sistema antioxidativo descrito anteriormente, a hipótese do presente trabalho foi de que o Si potencializaria mecanismos de resistência da soja à mancha olho de rã via modificações no metabolismo antioxidativo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do Si no sistema antioxidativo, na concentração de espécies reativas de oxigênio, nos danos celulares decorrentes do processo infeccioso de *C. sojina* e, conseqüentemente, na resistência da soja à mancha olho de rã.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparo da solução nutritiva.** A solução nutritiva foi preparada com base na solução proposta por Clark (1975), com algumas modificações, sendo constituída por: 1,04 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,8 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,069 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,931 mM  $\text{KCl}$  e 0,6 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 19  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 7  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 90  $\mu\text{M}$  EDTA. O Si foi suprido como ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, forma  $\text{H}^+$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma *et al.*, 2002). O Si foi adicionado à solução nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mM (+Si).

**Crescimento das plantas.** Sementes de soja das cultivares Bossier e Conquista, suscetível e resistente a *C. sojina*, respectivamente (Gravina *et al.*, 2004; Juliatti *et al.*, 2006), foram desinfestadas por 3 min em solução de hipoclorito de sódio 10%, lavadas em água desionizada e germinadas em rolos de papel “germiteste” em uma câmara de germinação a 25°C. Após germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em vasos plásticos contendo solução nutritiva com 1/4 da força iônica da solução anteriormente citada, mas sem adição de Si. Após esse período, três plântulas foram transferidas para novos vasos plásticos com 5 L de solução nutritiva com a força iônica total, contendo ou não Si, sob aeração contínua. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 5,8. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ , a  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

**Preparo do inóculo.** O isolado de *C. sojina* (UFV-22), cedido pelo Prof. Tuneo Sedyama (Departamento de Fitotecnia da UFV), foi preservado em tiras de papel-filtro em sílica gel a 4°C. Dez dias antes da inoculação, pedaços dessas tiras foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após o crescimento micelial, discos de meio contendo o fungo foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio V8. As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h durante 7 dias. Após a indução da produção de conídios, foram adicionados 10 mL de água desionizada contendo gelatina 1% (m/v) em cada placa de Petri e os conídios foram cuidadosamente removidos com pincel de cerdas macias. A suspensão de conídios foi calibrada em hemacitômetro para uma concentração de  $4 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

**Procedimento de inoculação das plantas.** Após 20 dias da adição de Si na solução nutritiva, na superfície adaxial e abaxial de todas as folhas de cada planta (estádio V6)

(Fehr *et al.*, 1971) foram pulverizados 20 mL da suspensão de conídios do isolado de *C. soja* UFV-22 na concentração de  $4 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, utilizando-se um atomizador (VLS-Set Airbrush, Companhia Paache Airbrush, USA). Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmaras de crescimento de plantas (CCP), instaladas dentro da casa de vegetação, permanecendo até o final dos experimentos. As CCP, construídas de madeira, possuem 2 m de largura, 1,5 m de altura, 5 m de comprimento e cobertura com plásticos de 100 µm de espessura. Dentro da CCP, a densidade máxima de fluxo de fótons na altura do dossel foi de aproximadamente 700 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e a temperatura foi de 25 ± 2°C e 20 ± 2°C durante o dia e noite, respectivamente. A umidade relativa foi mantida a 92 ± 3% mediante a um sistema de nebulização (NEB-100; KGF Companhia, São Paulo, Brasil), o qual foi programado para pulverizar névoa por 15 segundos a cada 30 min acima da copa das plantas. A umidade relativa e a temperatura foram mensuradas com um termo-hidrógrafo (TH-508, Impac, Brasil). As plantas inoculadas ou não inoculadas foram mantidas em câmaras separadas, porém sob as mesmas condições até o final do experimento.

**Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si.** Para a avaliação da severidade da doença aos 16 dai, selecionou-se a sexta folha, do ápice para a base, por essa apresentar maior severidade da doença. Para isto, as folhas foram digitalizadas em resolução de 600 dpi, e as imagens foram processadas utilizando-se o software Quant (Liberato, 2003). A porcentagem da área foliar com sintomas da mancha olho de rã foi considerada a estimativa da severidade pelo Quant (Seq). Após esse processo, essas folhas foram secas para a determinação da concentração foliar de Si, a qual foi realizada conforme descrito por Korndörfer *et al.* (2004).

**Avaliações bioquímicas:** Para todas as análises bioquímicas, selecionou-se o quarto, quinto e sexto trifólios das plantas, a partir da base, coletados aos 8, 14 e 16 dai.

As atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases inespecíficas (POX, EC 1.11.7), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), peroxidase da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9), glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) e redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2) foram determinadas conforme descrito por Debona *et al.* (2012). Com exceção da SOD, a atividade das enzimas analisadas foi expressa em base de proteína, cuja concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

As concentrações de ascorbato (AsA) e de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinadas, respectivamente, conforme descrito por Kampfenkel *et al.* (1995) e Griffith (1980). Para a determinação da concentração de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), amostras de 0,2 g de tecido foliar foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido. O pó obtido foi

homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,2), contendo dietilditiocarbamato de sódio 1 mM (DDC). O homogeneizado foi centrifugado a 22.000 *g* durante 20 min, a 4 °C. Após centrifugação, 0,1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,9 mL da solução constituída de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,2), DDC 1 mM e azul de *p*-nitro-tetrazólio 0,25 mM. A concentração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi determinada pela absorbância do produto final subtraída da absorbância inicial, as quais foram mensuradas a 540 nm (Chaitanya e Naithani, 1994). As concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de aldeído malônico (MDA) foram determinadas conforme descrito por Debona *et al.* (2012).

**Delineamento experimental e análise estatística dos dados.** Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para a concentração foliar de Si foi utilizado o esquema fatorial 2 × 2 × 2, consistindo em plantas não supridas (-Si) ou supridas com Si (+Si), duas cultivares de soja (Bossier e Conquista) e plantas inoculadas ou não com *C. sojina*. A severidade da mancha olho de rã foi avaliada, em plantas inoculadas, utilizando o esquema fatorial 2 × 2 (plantas -Si ou +Si) e as duas cultivares de soja. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados utilizando-se o esquema fatorial 2 × 2 × 2 × 3: dois níveis de Si, duas cultivares, plantas inoculadas ou não e três épocas de avaliação (8, 14 e 16 dai). Cada unidade experimental foi constituída de um vaso plástico de 5 L com três plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t* ( $P \leq 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS

**Concentração foliar de Si.** Para os dois experimentos, apenas o fator concentrações de Si foi significativo para a concentração de Si foliar (Tabela 1). Independentemente da cultivar de soja, a concentração foliar de Si foi maior para as plantas do tratamento +Si em relação às do tratamento -Si (Tabela 2).

**Severidade da mancha olho de rã.** Os fatores cultivares e concentrações de Si, bem como sua interação, foram significativos para a severidade da mancha olho de rã (Tabela 3). Os valores de severidade foram menores para a cv. Conquista do que para a cv. Bossier, independente da concentração de Si na solução nutritiva (Tabela 4 e Figura 1). A severidade foi maior para o tratamento +Si do que para o -Si, independentemente da cultivar (Tabela 4 e Figura 1).

**Variáveis bioquímicas.** Todas as variáveis bioquímicas foram significativamente influenciadas por pelo menos um dos fatores estudados, bem como algumas interações duplas e triplas entre eles (Tabela 5). A interação dos fatores cultivares  $\times$  inoculação  $\times$  épocas de avaliação  $\times$  concentrações de Si foi significativa para a atividade da SOD, CAT, GPX e GR, bem como para as concentrações de AsA,  $O_2^-$  e MDA (Tabela 5).

Na ausência do patógeno, as atividades da SOD, CAT, POX e APX foram menores e a da GR foi maior na cv. Bossier para o tratamento +Si do que para o -Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 2A, C, E, G e M). Menor atividade da GPX foi observada para o tratamento +Si em relação ao -Si aos 14 e 16 dai (Figura 2I). Na cv. Conquista, a atividade da SOD foi menor para o tratamento +Si do que para o -Si aos 8 dai (Figura 3A). Para as enzimas CAT, POX e APX, menores valores de atividade foram reportados para o tratamento +Si em relação ao -Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3C, E e G). A atividade da GR foi menor no tratamento +Si em relação ao -Si aos 14 e 16 dai (Figura 3M). Para a GPX, houve menor atividade para o tratamento +Si comparado ao -Si aos 14 dai (Figura 3I).

Nas plantas inoculadas da cv. Bossier, a atividade da SOD e CAT foi menor no tratamento +Si comparado ao -Si aos 8 e 14 dai. Aos 16 dai, no entanto, a atividade da SOD foi maior para o tratamento +Si em relação ao -Si (Figura 2B e D). Para a POX, menor e maior atividade ocorreram no tratamento +Si comparado ao -Si aos 14 e 16 dai, respectivamente (Figura 2E). Aos 16 dai, houve maior atividade da APX para o tratamento +Si do que para o -Si (Figura 2G). A atividade da GPX foi menor e maior aos 8 e 16 dai, respectivamente, para o tratamento +Si em relação ao -Si, enquanto o inverso ocorreu para a atividade da GR (Figura 2J e N). As plantas do tratamento +Si apresentaram maior atividade da GST aos 14 e 16 dai comparadas às do tratamento -Si (Figura 2L). Para as plantas inoculadas da cv. Conquista, a SOD foi menor para o tratamento +Si em relação ao

-Si aos 14 dai (Figura 3B), e as atividades da CAT e GR foram menores para o tratamento + Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3D e N). Ainda, aos 8 e 14 dai houve menor atividade da GST no tratamento +Si do que no -Si (Figura 3L).

Plantas inoculadas do tratamento -Si da cv. Bossier apresentaram menor e maior atividade da SOD aos 8 e 14 dai, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas (Figura 2A e B). Houve maior atividade da POX, APX e GR para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 14 e 16 dai (Figura 2E, F, G, H, M e N). Para a atividade da GST, maiores valores foram encontrados para as plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 16 dai (Figura 2K e L). Para as plantas do tratamento -Si da cv. Conquista, houve maior atividade da SOD e GPX nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 14 e 16 dai (Figura 3A, B, I e J); aos 8 dai, contudo, o inverso ocorreu para a atividade da SOD (Figura 3A e B). As plantas inoculadas apresentaram menor atividade da CAT aos 14 dai e maior atividade da POX aos 16 dai do que as plantas não inoculadas (Figura 3C, D, E e F). Para a APX, menor e maior atividades foram observadas aos 8 e 16 dai, respectivamente, para as plantas inoculadas comparadas às não inoculadas (Figura 3G e H). Houve maior atividade da GR nas plantas inoculadas aos 8, 14 e 16 dai em relação às plantas não inoculadas (Figura 3M e N). Plantas inoculadas apresentaram maior atividade da GST em relação às não inoculadas aos 8 e 14 dai, porém resultado inverso foi observado aos 16 dai (Figura 3K e L).

Nas plantas do tratamento +Si da cv. Bossier, as atividades da SOD, CAT e GST foram maiores para as plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 14 e 16 dai (Figura 2A, B, C, D, K e L). As atividades da POX e APX foram maiores nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 2E, F, G e H). Aos 8 dai, houve menor atividade da GPX nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas, enquanto o contrário foi observado aos 14 e 16 dai (Figura 2I e J). Houve maior e menor atividade da GR nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 8 e 16 dai, respectivamente (Figura 2M e N). Para as plantas do tratamento +Si da cv. Conquista, a infecção por *C. sojina* resultou em aumento na atividade da SOD aos 16 dai (Figura 3A e B). Para a CAT, houve menor atividade para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 14 e 16 dai (Figura 3C e D). As atividades da APX, GPX e GR foram maiores para as plantas inoculadas aos 14 e 16 dai em relação às não inoculadas (Figura 3G, H, I, J, M e N). A infecção por *C. sojina* resultou em aumento da atividade da POX aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3E e F). Para a GST, houve maior atividade para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 8 dai (Figura 3K e L).

Para as plantas não inoculadas das duas cultivares, não houve diferença entre os tratamentos -Si e +Si para as concentrações de AsA, GSH, GSSG,  $H_2O_2$ , MDA e  $O_2^-$  (Figura 4A, C e E; Figura 5A, C e E; Figura 6A, C e E; Figura 7A, C e E). Para as plantas inoculadas da cv. Bossier, houve menor concentração de AsA para o tratamento +Si do que para o -Si aos 14 e 16 dai (Figura 4B). Para GSH, houve menor concentração nas plantas do tratamento +Si em relação ao -Si aos 14 e 16 dai (Figura 4D). A concentração de GSSG foi maior no tratamento +Si do que no -Si aos 14 dai (Figura 4F). Para as plantas inoculadas da cv. Conquista, a concentração de AsA foi maior e menor aos 14 e 16 dai, respectivamente, para o tratamento +Si comparado ao -Si (Figura 5B). Para a concentração de GSH, maiores valores foram encontrados no tratamento +Si em relação ao -Si aos 14 e 16 dai (Figura 5H). A concentração de GSSG foi menor no tratamento +Si do que no -Si aos 14 dai (Figura 5F).

Para o tratamento -Si, a inoculação das plantas acarretou aumento na concentração de AsA aos 8 e 16 dai para as cvs. Bossier e Conquista, respectivamente (Figura 4A e B; Figura 5A e B). Houve maior concentração de GSH nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas em todas as épocas de avaliação para a cv. Bossier e aos 8 e 16 dai para a cv. Conquista (Figura 4C e D; Figura 5C e D). A concentração de GSSG foi maior aos 8 dai nas plantas inoculadas das cvs. Bossier e Conquista em relação às não inoculadas, porém o inverso ocorreu aos 14 dai para a cv. Bossier e aos 14 e 16 dai para a cv. Conquista (Figura 4E e F; Figura 5E e F). Para o tratamento +Si, houve maior concentração de AsA nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 8 e 14 dai para as cvs. Bossier e Conquista, respectivamente (Figura 4A e B; Figura 5A e B). A concentração de GSH foi maior nas plantas inoculadas aos 8 e 14 dai para a cv. Bossier e aos 8, 14 e 16 dai para a cv. Conquista em relação às plantas não inoculadas (Figura 4C e D; Figura 5C e D). Maior concentração de GSSG foi observada nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 8 dai para as duas cultivares; o contrário foi observado aos 14 dai para a cv. Bossier e aos 14 e 16 dai para a cv. Conquista (Figura 4E e F; Figura 5E e F).

Para as plantas inoculadas da cv. Bossier, a concentração de  $O_2^-$  foi menor e maior para o tratamento +Si aos 14 e 16 dai, respectivamente, comparado ao -Si (Figura 6B). Houve menor concentração de  $H_2O_2$  para o tratamento +Si do que para o -Si aos 8 dai (Figura 6D). A concentração de MDA foi maior no tratamento +Si em relação ao -Si, independente da época de avaliação (Figura 6F). Para a cv. Conquista, a concentração de  $O_2^-$  foi maior no tratamento +Si comparado ao -Si aos 8 e 14 dai, mas aos 16 dai o inverso foi observado (Figura 7B). Para o  $H_2O_2$ , maiores concentrações foram registradas no tratamento +Si em relação ao -Si aos 14 e 16 dai (Figura 7D). Houve menor concentração

de MDA no tratamento +Si em relação ao -Si aos 16 dai (Figura 7F). Para as plantas inoculadas do tratamento -Si da cv. Bossier houve maior concentração de  $O_2^-$  do que nas plantas não inoculadas aos 14 e 16 dai (Figura 6A e B). As concentrações de  $H_2O_2$  e MDA foram maiores nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas, independente da época de avaliação (Figura 6C, D, E e F). Para as plantas da cv. Conquista do tratamento -Si, as concentrações de  $O_2^-$  e MDA aos 8, 14 e 16 dai e as de  $H_2O_2$  aos 16 dai foram maiores nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas (Figura 7A, B, C, D, E e F). Para o tratamento +Si, as plantas inoculadas das duas cultivares apresentaram maior concentração de MDA aos 8, 14 e 16 dai e de  $H_2O_2$  aos 14 e 16 dai em relação às plantas não inoculadas (Figura 6C, D, E e F; Figura 7C, D, E e F). A concentração de  $O_2^-$  foi maior nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai para a cv. Conquista e aos 16 dai para a cv. Bossier (Figura 6A e B; 7A e B).

Para a cv. Bossier, houve correlação positiva entre a atividade da SOD e a atividade das enzimas POX, APX, GPX e GST, e as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e de Si e com a severidade da doença, e correlações negativas foram observadas entre a atividade da SOD e a atividade da GR e com as concentrações de AsA e GSH (Tabela 6). Houve correlação positiva da POX com as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade, porém sua correlação foi negativa com as concentrações de AsA e GSH. Houve correlação positiva da APX com as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade, enquanto ela foi negativamente correlacionada com a GR e a concentração de GSH. A atividade da GPX foi positivamente correlacionada com as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade, e negativamente correlacionada com a atividade da GR e concentração de GSH. Houve correlação positiva da atividade da GST com as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade, e correlação negativa com a atividade da GR e concentração de GSH. A atividade da GR foi positivamente correlacionada com a concentração de GSH e negativamente correlacionada com as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade. A concentração de AsA foi negativamente correlacionada com a concentração de  $O_2^-$ . Houve correlação negativa entre a concentração de GSH e as concentrações de  $O_2^-$ , MDA e Si, e severidade. A concentração de  $O_2^-$  foi positivamente correlacionada com as concentrações de MDA e Si, e severidade. Houve correlação positiva entre a concentração de MDA e a de Si, e severidade. A concentração de Si foi positivamente correlacionada com a severidade. Para a cv. Conquista, a atividade da SOD foi positivamente correlacionada com a atividade da POX e a severidade (Tabela 6). Para a atividade da CAT, foi observada correlação positiva com a concentração de MDA e negativa com a concentração de  $H_2O_2$  e Si. A atividade da GR foi positivamente correlacionada com as concentrações de  $O_2^-$  e MDA, e

negativamente correlacionada com as concentrações de GSH,  $H_2O_2$  e Si, e severidade. Houve correlação positiva entre a concentração de AsA e a concentração de  $O_2^-$  e negativa com a concentração de Si. A concentração de GSH foi positivamente correlacionada com a concentração de Si e severidade e negativamente correlacionada com as concentrações de  $O_2^-$  e MDA. A concentração de  $H_2O_2$  foi positivamente correlacionada com a de Si e com a severidade e negativamente correlacionada com a concentração de MDA. A correlação entre a concentração de MDA e a de Si foi negativa, enquanto que a concentração de Si foi positivamente correlacionada com a severidade.

## DISCUSSÃO

Embora vários estudos tenham demonstrado que o Si reduz a intensidade de doenças fúngicas em várias culturas economicamente importantes (Datnoff *et al.*, 2007), o presente estudo fornece as primeiras evidências de que o Si aumenta a suscetibilidade de plantas de soja à mancha olho de rã, independentemente do nível de resistência da cultivar. Considerando que a infecção dos tecidos foliares da soja por *C. sojae* é beneficiada pela alta concentração de EROs decorrente da ação de toxinas secretadas pelo fungo (Daub, 1982a; Daub e Briggs, 1983; Kim *et al.*, 2011), é sugerido que um sistema antioxidativo basal menos robusto mediado pelo Si tenha favorecido a colonização dos tecidos foliares de soja pelo fungo *C. sojae*, especialmente para a cultivar suscetível. Isso pôde ser evidenciado pela menor atividade da maioria das enzimas do sistema antioxidativo observada nas plantas supridas com Si e não inoculadas com o fungo. Corroborando esses dados, Shen *et al.* (2010) reportaram que o suprimento de plantas de soja com 1,7 e 2,5 mM de Si acarretou em redução na atividade da SOD e POX na ausência de estresse. Em adição, Zhu *et al.* (2004) também demonstraram redução na atividade da GPX em plantas de pepineiro não estressadas supridas com Si em relação às não supridas com esse elemento. No presente estudo, o mecanismo menos robusto de remoção de EROs mediado pelo Si em plantas de soja na ausência de estresse não alterou as concentrações dos metabólitos AsA, GSH e GSSG, tampouco as de  $O_2^-$ , MDA e  $H_2O_2$ , independentemente da cultivar. Entretanto, Shen *et al.* (2010) observaram maior concentração de MDA em plantas de soja da cultivar Zhonghuang 13 supridas com 2,5 mM de Si. Resultado contrário foi encontrado em pepineiro, efeito que foi atribuído à menor produção de  $H_2O_2$  nas plantas supridas com 1 mM desse elemento (Zhu *et al.*, 2004). Esses dados evidenciam que o efeito do Si sobre o sistema antioxidativo e, conseqüentemente, sobre o dano celular em plantas crescidas na ausência de estresse, pode variar entre espécies, bem como entre genótipos da mesma espécie vegetal.

De modo geral, o efeito do Si sobre o sistema antioxidativo em plantas da cv. Bossier foi similar até 14 dai, independentemente da inoculação com *C. sojae*. Aos 16 dai, no entanto, a atividade da maioria das enzimas do sistema antioxidativo em plantas supridas com Si e infectadas foi intensificada, provavelmente como consequência da aumentada produção de EROs, especialmente o  $O_2^-$ , mediada pela ação de toxinas produzidas pelo fungo. Isso foi evidenciado pela correlação positiva da concentração de  $O_2^-$  com a severidade e a concentração de Si foliar. Nesse caso, o aumento na produção de  $O_2^-$  foi relacionado positivamente com a maior atividade da SOD, a qual é

considerada a primeira linha de defesa na remoção de EROs (Mao *et al.*, 2012). No entanto, sabendo-se que o produto de reação da SOD é o  $H_2O_2$ , a atuação de outras enzimas ou metabólitos envolvidos na remoção dessa ERO diminui os riscos da formação do radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) (Li *et al.*, 2012), o qual pode reagir com a maioria das moléculas em uma velocidade muito superior à das demais EROs (Li *et al.*, 2012). No entanto, neste estudo, a maior atividade das enzimas envolvidas na remoção de  $H_2O_2$ , como POX, APX, GPX e GST nas plantas da cv. Bossier supridas com Si não foi suficiente para a redução do dano oxidativo desencadeado pela infecção por *C. sojina*, pois o aumento dessas enzimas foi relacionado positivamente com o dano oxidativo e com o teor de Si foliar. Em contrapartida, os metabólitos AsA e GSH foram cruciais para a remoção de  $O_2^-$ , pois a maior concentração dessas moléculas nas plantas da cv. Bossier não supridas com Si resultou em menor concentração de  $O_2^-$ . Em adição, o incremento na concentração de GSH foi relacionado com a menor concentração de MDA e com a severidade da mancha olho de rã nas plantas não supridas com Si. Tanto GSH quanto AsA atuam diretamente na remoção de EROs. Além disso, a GSH está envolvida na síntese de moléculas de defesa contra patógenos, como a proteína relacionada com a patogênese PR-1, metabólitos secundários, hormônios, fitoalexinas (Noctor *et al.*, 2012) e de AsA, via redução do monodesidroascorbato (Morell *et al.*, 1997). Portanto, neste estudo, a maior capacidade de regeneração da GSH devida à maior atividade da GR resultou em menor suscetibilidade das plantas da cultivar suscetível não supridas com Si em relação às plantas supridas com esse elemento, conforme evidenciado pela correlação positiva entre a atividade da GR e a concentração de GSH e a correlação negativa entre a atividade da GR e a concentração de Si foliar.

Embora as plantas da cultivar resistente supridas com Si e infectadas por *C. sojina* tenham apresentado, de modo geral, maior concentração de EROs e menor atividade da SOD, CAT, GST e GR em relação às plantas não supridas com Si, isso não acarretou maior dano celular. Esse resultado sugere que o aumento da severidade da mancha olho de rã devido ao suprimento com Si aumentou o estado defensivo dessas plantas mediante mecanismo não enzimático, o que é corroborado pelo fato de que a maior severidade esteve relacionada com a maior concentração da GSH e com a menor concentração de MDA aos 16 dai. Em adição, o proeminente aumento na concentração de  $O_2^-$  até os 14 dai nas plantas supridas com Si e infectadas por *C. sojina* em relação às plantas não supridas, possivelmente, propiciou aumento na síntese *de novo* de AsA aos 14 dai, o que pôde ser evidenciado pelo aumento expressivo na concentração dessa molécula.

Diferentemente dos dados encontrados no presente trabalho, diversos estudos reportaram que o Si potencializa o aumento da resistência de plantas contra patógenos mediante aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidativo e, conseqüentemente, redução do dano celular (Sun *et al.*, 2010; Mohaghegh *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012). Contudo, Li *et al.* (2012) reportaram que frutos de melão tratados com Si e, em seguida infectados por *Trichothecium roseum*, apresentaram aumento no dano celular via incremento na produção de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ , além de redução na atividade da CAT e APX quando comparados aos frutos não tratados com Si. Diferentemente do encontrado no presente trabalho, aqueles autores concluíram que a maior produção de EROs nos frutos de melão desencadeado pelo Si foi crucial para reduzir a severidade da doença causada por *T. roseum*. Da mesma forma, o aumento de EROs potencializado pelo Si também contribui para a redução da brusone do arroz, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Sun *et al.*, 2010). Nesse caso, o aumento das EROs foi atribuído à redução na atividade CAT e aumento da lipoxigenase, as quais atuam na redução e formação de  $H_2O_2$ , respectivamente (Barna *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2010). Isso evidencia que a menor severidade da brusone mediada pelo Si foi devida à indução da reação de hipersensibilidade (HR) (Sun *et al.*, 2010). No entanto, a existência de um mecanismo mais eficiente na remoção das EROs parece ser de suma importância para a resistência das plantas a *C. sojina*, conforme observado para as plantas infectadas não supridas com Si.

Contudo, o aumento na atividade da maioria das enzimas envolvidas na remoção de EROs analisadas, bem como na concentração de GSH e AsA não foi suficiente para as plantas de ambas as cultivares lidarem com a alta pressão oxidativa desencadeada pela infecção por *C. sojina*, independentemente do suprimento com Si, especialmente para a cultivar suscetível. Portanto, a infecção das plantas por *C. sojina* acarretou a peroxidação de lipídios mediante do desbalanço entre a produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  e os mecanismos de remoção dessas EROs tanto enzimáticos quanto não enzimáticos. Notadamente, a maior atividade da enzima GST induzida pela infecção das plantas aos 8 dai apenas para a cv. Conquista evidencia a sua importância para a resistência de plantas de soja contra *C. sojina*. Essa enzima é considerada uma marcadora de resistência, pois sua expressão é altamente respondente a vários tipos de estresses (Marrs, 1996), sendo responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos, como  $H_2O_2$  e fosfolipídicos hidroperóxidos, a GSH, reduzindo os níveis de EROs intracelulares (Pickett e Lu, 1989; Marrs, 1996), o que limita o crescimento de fungos necrotróficos. A importância de um mecanismo eficiente de remoção das EROs para a

resistência das plantas a patógenos tem sido amplamente documentada. Hao *et al.* (2012), por exemplo, reportaram incremento na atividade da SOD em plantas de arroz infectadas por *Magnaporthe oryzae*, o que limitou o acúmulo de altos níveis EROs nas células, restringindo, portanto, o desenvolvimento do patógeno. Adicionalmente, Debona *et al.* (2012) reportaram que a maior eficiência do sistema antioxidativo, via aumento na atividade das enzimas SOD, POX, APX, GST, GR e CAT, contribuiu para a redução do excesso de EROs gerado durante o processo infeccioso de *Pyricularia oryzae* e, conseqüentemente, para a maior resistência das plantas de trigo à brusone. Recentemente, Ge *et al.* (2013) reportaram que a atividade das enzimas APX, GR e os níveis de GSH e AsA foram aumentados em plantas de meloeiro em resposta a infecção por *Colletotrichum lagenarium*, o que foi importante para o aumento da resistência.

Neste estudo, a manutenção de maior concentração de GSH e menor concentração de GSSG nas plantas de soja infectadas por *C. sojina* se deu mediante o incremento da redução da GSSG pelo aumento na atividade da GR. Porém, isso não foi suficiente para as plantas evitarem o dano oxidativo desencadeado pela alta produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  decorrente da infecção pelo fungo. No entanto, o aumento da GSH pode ter contribuído para a indução da expressão de genes que codificam para as enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e chalcona sintase (CHS), conforme observado por Dron *et al.* (1988) em suspensão de células de plantas de soja. A FAL é enzima chave para a produção de substâncias envolvidas na resistência de plantas a patógenos, como compostos fenólicos com potencial antimicrobiano, síntese de lignina, antocianinas e ácido salicílico, além de certas classes de fitoalexinas (Schuster e Rétey, 1995, Borges *et al.*, 2012), enquanto a CHS é a primeira enzima na síntese de flavonóides (Dixon e Paiva, 1995), classe de compostos que também estão envolvidos nas respostas de defesa vegetal (Jia *et al.*, 2010).

Uma vez que o aumento na capacidade antioxidativa regula negativamente a infecção foliar por *C. sojina*, mediante decréscimo na concentração de EROs, é plausível inferir que o mecanismo antioxidante basal menos robusto mediado pelo Si foi determinante para o aumento na suscetibilidade das plantas de soja a *C. sojina*. No entanto, a realização de novos estudos fisiológicos e moleculares nos ajudará na melhor compreensão das causas que regem o efeito negativo desse elemento para o controle da mancha olho de rã.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida AMR, Ferreira JT, Yorinori JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC. (2005a) Doenças da soja (*Glycine max*). In: Doenças das Plantas Cultivadas, pg. 574, Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin A, Camargo LEA (Eds). Editora Agronômica.
- Almeida AMR, Piuga FF, Marin SRR, Binneck E, Sartori F, Costamilan LM, Teixeira MRO, Lopes M. (2005b) Pathogenicity, molecular characterization, and Cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. Fitopatologia Brasileira 30: 594-602.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of experimental Botany, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue 53: 1331-1341.
- Apel K, Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review Plant Biology 55: 373-399.
- Baker CJ, Orlandi EW. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. Annual Review Phytopathology 33: 299-321.
- Barna B, Fodor J, Harrach BD, Pogány M, Király Z. (2012). The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. Plant Physiology and Biochemistry 59: 37-43.
- Borges A, Melotto M, Tsai SM, Caldas DGG. (2012) Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. Journal of Plant Physiology 169: 1216-1220.
- Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Cakmak L, Horst WJ. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). Plant Physiology 83: 463-468.
- Chaitanya KSK, Naithani SC. (1994) Role of superoxide lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Faern. New Phytologist 126: 623-627.
- Clark RB. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. Journal Agricultural Food Chemistry 23: 458-460.

- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC. (2011) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice. *Phytopathology* 101: 92-104.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW. (2007) Silicon and plant nutrition. In: Datnoff LE, ElmerWH, Huber DM, eds. *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, MN, USA: APS Press, 233-46.
- Daub ME (1982b.) Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 69: 1361-1364.
- Daub ME, Briggs S. (1983) Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. *Plant Physiology* 71: 763-766.
- Daub ME, Ehrenshaft M. (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contribution to plant diseases and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* 38: 461-490.
- Daub ME. (1982a) Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* 72: 370-374.
- Debona D, Rodrigues FA, Rios JA, Nascimento KJT. (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102: 1121-1129.
- Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. (2009) Enzyme activities and subcellular localization of member of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany* 60: 1207-1218.
- Dixon RA, Paiva NL. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ. (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defence promoter in electroporated protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 6738-6742.
- Epstein E. (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 11-17.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929-931.
- Gay C, Gerbicki JM. (2000) A critical evaluation of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284: 217-220.
- Ge Y, Bi Y, Guest DI. (2013) Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81: 13-21.

- Gnanamangai BM, Ponmurugan P, Yazhini R, Pragadeesh SK. (2011) PR enzymes activities of *Cercospora theae* causing bird's eye spot disease in tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O.kuntze). *Plant Pathology Journal* 10: 13-21.
- Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S, Zhanga C. (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science* 169: 313-321.
- Gravina GA, Sedyama CS, Martins SF, Moreira MA, Cruz CD. (2004) Multivariate analysis of combining ability for soybean resistance to *Cercospora sojina* Hara. *Genetics and Molecular Biology* 27: 395-399.
- Griffith OW. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.
- Gunes A, Inal, A, Bagci EG, Coban S, Sahin O. (2007) Silicon increases boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron. *Biologia Plantarum* 51: 571-574.
- Hao Z, Wang L, Liang J, Tao R. (2012) Expression of defense genes and activities of antioxidant enzymes in rice resistance to rice stripe virus and small brown planthopper. *Plant Physiology Biochemistry* 7: 44-51.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Jia Z, Zou B, Wang X, Qiu J, Ma H, Gou Z, Song S, Dong H. (2010) Quercetin-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 522-527.
- Juliatti FC, Hamawaki OT, Cunha EPC, Polizel AC, Santos MA, Shigihara D. (2006) Severidade de doenças fúngicas foliares em genótipos de soja em três locais de plantio. *Bioscience Journal* 22: 83-89.
- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D. (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225: 165-167.
- Kim J-S, Lee Y-S, Kim S-K, Kim KD, Kim J-W. (2011) Differential responses of soybean cultivars to *Cercospora sojina* isolates, the causal agent of frog-eye leaf spot in Korea. *The Plant Pathology Journal* 27: 183-186.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 24 pp.

- Kuo MC, Kao CH. (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46: 149-152.
- Lemes EM, Mackowiak CL, Blount A, Marois JJ, Wright DL. (2011) Effect of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. *Plant Disease* 95: 317-324.
- Li W, Bi Y, Ge Y, Li Y, Wang J, Wang Y. (2012) Effects of postharvest sodium silicate treatment on pink rot disease and oxidative stress-antioxidative system in muskmelon fruit. *European Food Research and Technology* 234: 137-145.
- Liang Y, Chen Q, Liu Q, Zhang W, Ding R. (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal Plant Physiology* 160: 1157-1164.
- Liberato JR. (2003) Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- Lucena JAM, Gastal MFC, Casela CR, Vernetti FJ. (1982) Herança da resistência à raça 4 de *Cercospora sojina* Hara em soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 17: 1751:1755.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130: 2111-2117.
- Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS. (2007) Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Molecular Plant Microbe Interactions*. 20: 697-706.
- Mao B, Song W, Chen S, Liu X, Lai Q, Li D. (2012) Modification of membrane lipid peroxidation and antioxidant enzymes activation in transgenic rice resistance to *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology* 11: 4841-4148.
- Marrs KA. (1996) The functions and regulation of glutathione-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127-158.
- Mian MAR, Boerma HR, Phillips DV, Kenty MM, Shannon G, Shipe ER, Soffes AR, Weaver DB. (1998) Performance of frogeye leaf spot resistant and susceptible near isolines of soybean. *Plant Disease* 82: 1017-1021.
- Mian MAR, Missaoui AM, Walker DR, Phillips DV, Boerma HR. (2008) Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science* 48: 14-24.
- Missaoui AM, HA BK, Phillips DV, Boerma HR. (2007) Single nucleotide polymorphism detection of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science* 47: 1681-1690.

- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh AH, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N. (2011) Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in Cucumber. *Plant Disease* 95: 455-460.
- Morell S, Follmann H, De Tullio M, Häberlein I. (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicator of oxidative stress in plants. *Federation of European Biochemical Societies* 414: 567-570.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell & Environmental* 35: 454-484.
- Pereira SC, Rodrigues FA, Carré-Missio V, Oliveira MGA, Zambolim L. (2009) Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology* 34: 164-170.
- Pickett CB, Lu AYH. (1989) Glutathione-S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Review of Biochemistry* 58: 743-764.
- Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR. (2009) Aconitate and methyl aconitate are modulated by silicon in powdery mildew-infected wheat plants. *Journal Plant Physiology* 166: 1413-1422.
- Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira WR, Chaves ARM, DaMatta FM. (2012) Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102: 892-898.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA. (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-Magnaporthe grisea interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 144-159.
- Rodrigues FA, McNally D, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélange RR. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94: 177-183.
- Rodrigues FA, Valeb FXR, Korndorfer GH, Prabhud AS, Datnoff LE, Oliveira AMA, Zambolim L. (2003) Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection* 22: 23-29.
- Schuster B, Rétey J. (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 8433-8437.

- Shen X, Li X, Li Z, Li J, Duan L, Eneji E. (2010) Growth, physiological attributes and antioxidant enzyme activities in soybean seedlings treated with or without silicon under UV-B radiation stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 431-439.
- Sun W, Zhang J, Fan Q, Xu G, Li Z, Liang Y. (2010) Silicon-enhanced resistance to rice blast is attributed to silicon-mediated defence resistance and its role as physical barrier. *European Journal of Plant Pathology* 128: 39-49.
- Trachootham D, Lu WQ, Ogasawara MA, Valle NRD, Huang P. (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxidants Redox Signaling* 10: 1343-1374.
- Van Bockhaven J, De Vleeschauwer D, Höfte M. (2013) Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany* 64: 1281-1293.
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione-s-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49: 515-532.
- Xavier Filha MSX, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR. (2011) Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* 40: 28-38.
- Zhu Z, Wei G, Li J, Qian Q, Yu J. (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167: 527-533.

## TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Análise de variância dos efeitos de cultivares de soja, inoculação e concentrações de silício na solução nutritiva sobre a concentração foliar de silício.

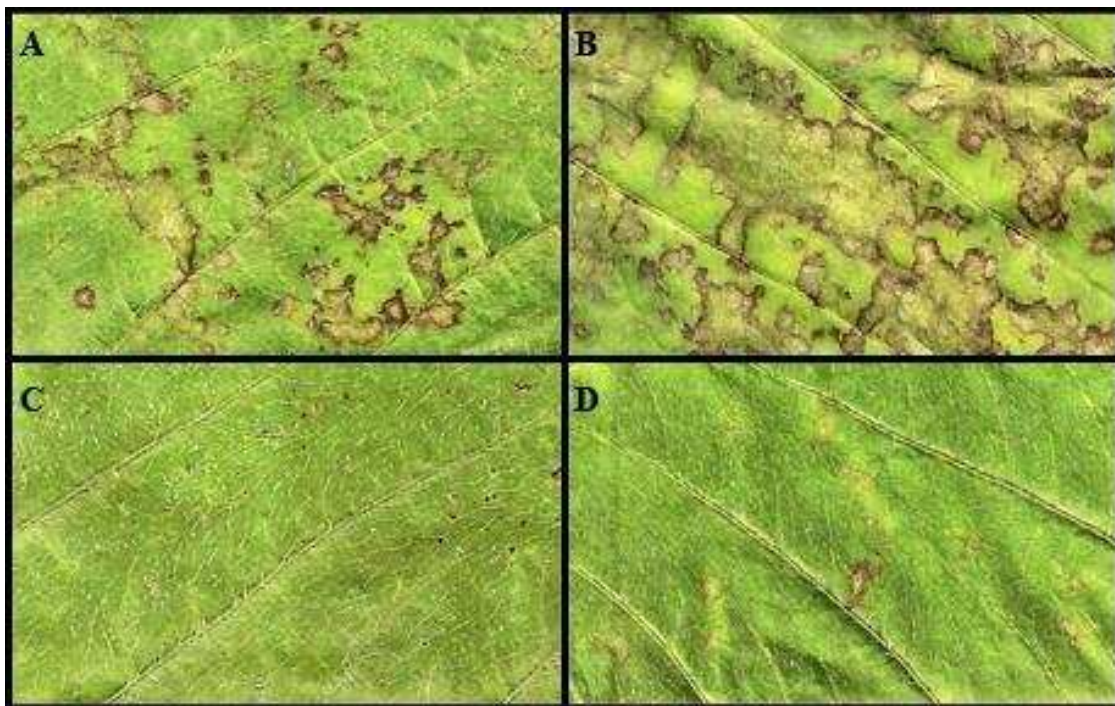
Causas de variação	Valores de $F^z$	
	Experimento 1	Experimento 2
Cultivares (C)	1,6	1,8
Inoculação (I)	0,1	0,7
Concentrações de silício (Si)	<b>384,7</b>	<b>2030,0</b>
C × I	0,9	0,1
C × Si	0,2	0,5
I × Si	0,1	0,1
C × I × Si	0,1	0,3

<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Concentração foliar de silício de plantas de soja das cvs. Bossier e Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Cercospora sojina*.

Fatores	Silício (dag kg <sup>-1</sup> ) <sup>z</sup>	
	Experimento 1	Experimento 2
Concentração de silício		
-Si	0,2	0,2
+Si	0,8	1,0
teste <i>t</i>	<b>20,7</b>	<b>47,1</b>
Cultivares		
Bossier	0,5	0,6
Conquista	0,5	0,6
teste <i>t</i>	0,3	0,2
Inoculação		
NI	0,5	0,6
I	0,5	0,6
teste <i>t</i>	0,1	0,1
CV (%)	14,7	8,0

<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.



**Figura 1.** Sintomas da mancha olho de rã em folíolos de plantas de soja das cvs. Bossier (A e B) e Conquista (C e D) cultivadas em solução nutritiva contendo 0 (A e C) ou 2 mM (B e D) de silício aos 16 dias após a inoculação com *Cercospora soja*.

**Tabela 3.** Análise de variância dos efeitos de cultivares de soja e concentrações de silício na solução nutritiva sobre a severidade da mancha olho de rã.

Causas de variação	Valores de <i>F</i>	
	Experimento 1	Experimento 2
Cultivares (C)	<b>203,3</b>	<b>202,2</b>
Concentrações de silício (Si)	<b>132,9</b>	<b>24,9</b>
C × Si	<b>115,9</b>	<b>19,8</b>

<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Severidade da mancha olho de rã em folíolos de plantas de soja das cvs. Bossier e Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) aos 16 dias após a inoculação com *Cercospora sojina*.

Cultivares	Severidade (%)			
	Experimento 1		Experimento 2	
	-Si	+Si	-Si	+Si
Bossier	5,83 bA	39,80 aA	11,87 bA	23,28 aA
Conquista	0,51 bB	1,68 aB	0,06 bB	0,71 aB
CV (%)	25,49		26,93	

Para cada experimento, médias dos tratamentos seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste *t* ( $P > 0,05$ ). CV = coeficiente de variação.

**Tabela 5.** Análise de variância dos efeitos de cultivares de soja, inoculação, épocas de avaliação e concentrações de silício na solução nutritiva sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX), glutatona-S-transferase (GST) e redutase da glutatona (GR) e nas concentrações de ascorbato (AsA), glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG), superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e aldeído malônico (MDA).

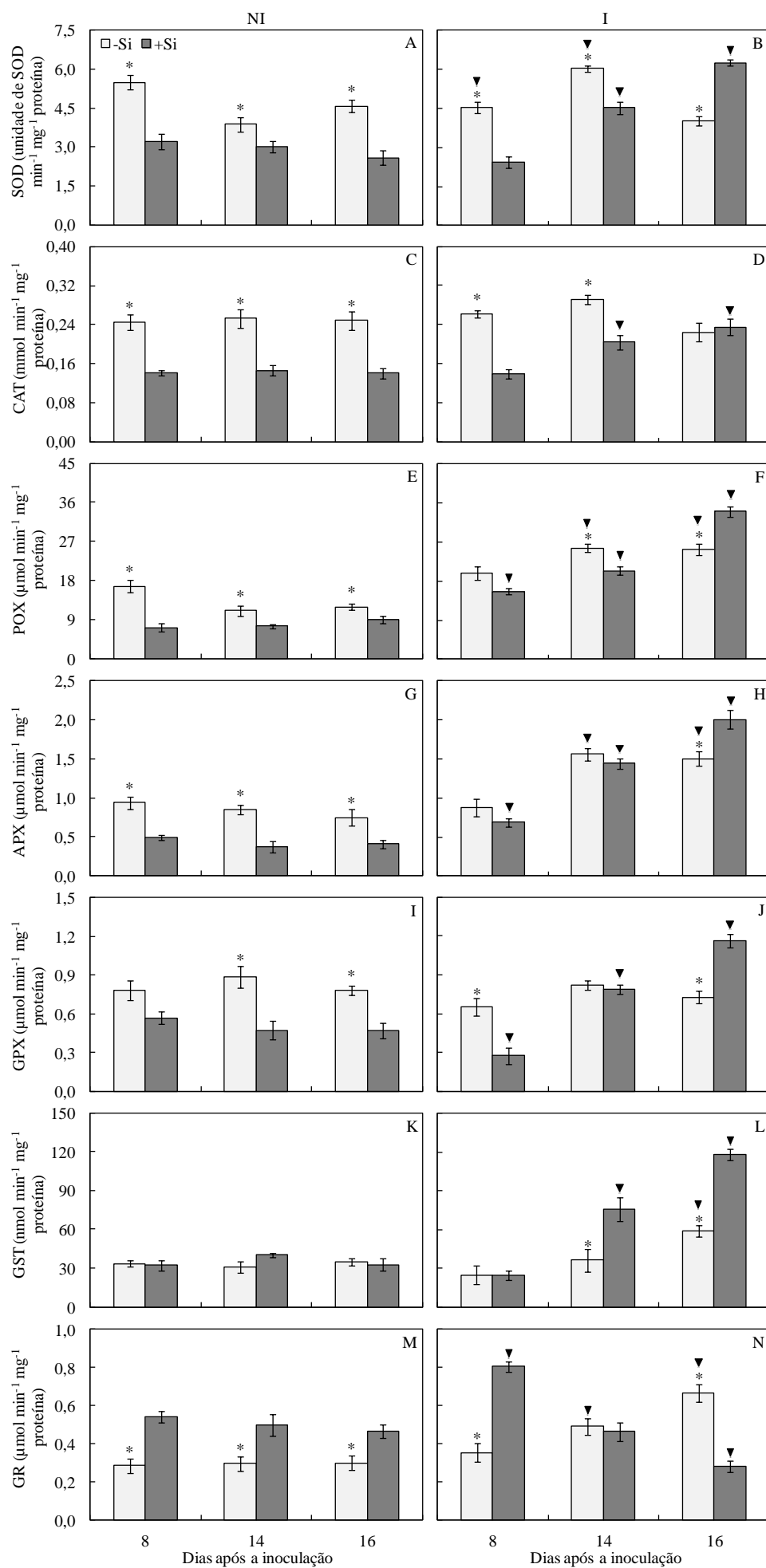
Causas de variação	Valores de $F^z$												
	SOD	CAT	POX	APX	GPX	GST	GR	AsA	GSH	GSSG	$O_2^-$	$H_2O_2$	MDA
Cultivares (C)	<b>49,3</b>	<b>561,8</b>	1,0	<b>22,5</b>	0,8	<b>84,7</b>	<b>32,8</b>	<b>25,4</b>	<b>57,8</b>	<b>19,9</b>	<b>5,5</b>	<b>184,2</b>	<b>90,2</b>
Inoculação (I)	<b>52,9</b>	2,3	<b>545,0</b>	<b>333,4</b>	<b>169,3</b>	<b>77,4</b>	<b>211,1</b>	<b>113,4</b>	<b>257,2</b>	<b>11,0</b>	<b>587,0</b>	<b>343,8</b>	<b>574,4</b>
Épocas de avaliação (EA)	<b>3,3</b>	<b>4,6</b>	<b>57,9</b>	<b>69,4</b>	<b>55,1</b>	1,6	2,0	<b>9,3</b>	2,7	<b>52,4</b>	57,0	<b>32,7</b>	<b>23,2</b>
Concentração de silício (Si)	<b>65,6</b>	<b>280,8</b>	<b>51,5</b>	<b>38,0</b>	<b>11,9</b>	0,1	<b>25,7</b>	3,7	<b>4,5</b>	0,3	19,2	<b>8,8</b>	<b>4,6</b>
C × I	3,9	<b>41,9</b>	<b>26,4</b>	2,3	<b>90,4</b>	<b>4,5</b>	<b>60,2</b>	1,7	0,3	<b>6,1</b>	<b>52,9</b>	<b>30,8</b>	<b>18,8</b>
C × EA	<b>4,0</b>	<b>16,3</b>	0,5	<b>9,5</b>	<b>5,0</b>	61,0	2,9	<b>17,4</b>	<b>33,3</b>	1,8	<b>40,4</b>	<b>22,5</b>	<b>4,4</b>
C × Si	<b>15,2</b>	0,4	1,0	1,4	<b>12,1</b>	<b>66,7</b>	<b>140,2</b>	<b>8,3</b>	2,1	<b>11,4</b>	<b>13,4</b>	<b>17,2</b>	<b>23,5</b>
I × EA	<b>64,57</b>	2,0	<b>72,7</b>	<b>108,8</b>	<b>77,3</b>	0,3	<b>5,1</b>	<b>9,4</b>	0,6	<b>49,5</b>	<b>29,2</b>	<b>22,9</b>	<b>9,1</b>
I × Si	<b>12,8</b>	0,9	<b>60,3</b>	<b>49,5</b>	<b>7,9</b>	3,2	<b>61,8</b>	2,6	0,7	0,6	<b>16,2</b>	3,1	<b>4,5</b>
EA × Si	<b>25,4</b>	<b>4,7</b>	<b>14,6</b>	<b>8,8</b>	<b>6,0</b>	<b>8,0</b>	<b>15,7</b>	<b>10,6</b>	0,6	2,7	<b>18,0</b>	<b>29,2</b>	1,0
C × I × EA	2,3	<b>11,4</b>	<b>5,1</b>	<b>7,7</b>	<b>11,3</b>	<b>78,4</b>	<b>6,6</b>	<b>20,7</b>	<b>27,5</b>	2,3	<b>77,3</b>	<b>3,3</b>	2,5
C × I × Si	<b>11,3</b>	<b>4,5</b>	<b>4,7</b>	0,1	<b>20,2</b>	<b>32,5</b>	3,8	<b>13,0</b>	<b>34,5</b>	0,1	<b>8,0</b>	<b>29,1</b>	<b>38,7</b>
C × EA × Si	<b>5,5</b>	2,0	<b>7,1</b>	0,5	<b>6,3</b>	2,8	<b>17,6</b>	<b>9,4</b>	<b>3,9</b>	0,4	<b>41,9</b>	0,1	0,7
I × EA × Si	<b>29,3</b>	2,5	<b>6,5</b>	<b>4,7</b>	<b>9,9</b>	<b>13,7</b>	<b>4,5</b>	<b>12,3</b>	0,6	0,1	<b>19,8</b>	<b>16,7</b>	0,7
C × I × EA × Si	<b>9,6</b>	<b>3,9</b>	3,1	1,3	<b>9,0</b>	0,4	<b>22,7</b>	<b>18,6</b>	2,1	1,9	<b>44,7</b>	0,2	<b>3,5</b>

<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ).

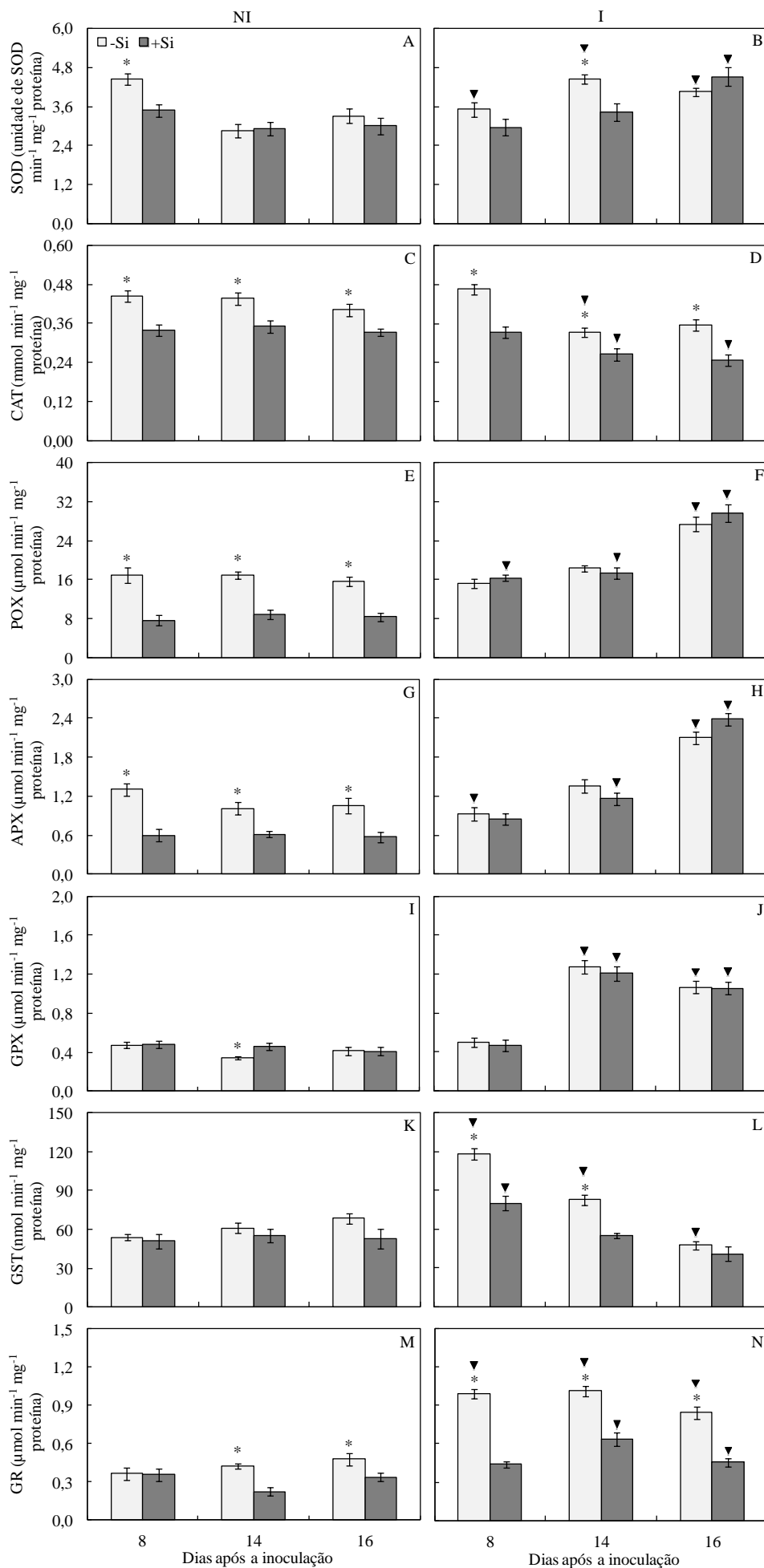
**Tabela 6.** Coeficientes de correlação de Pearson para as cvs. Bossier (acima da diagonal) e Conquista (abaixo da diagonal) entre a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX), glutatona-S-transferase (GST) e redutase da glutatona (GR), concentrações de ascorbato (AsA), glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG), superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), aldeído malônico (MDA) e silício foliar (Si) e severidade da mancha olho de rã (SEV) em folhas de plantas de soja crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício e inoculadas com *Cercospora sojina* aos 16 dias após a inoculação.

Variáveis <sup>z</sup>	SOD	CAT	POX	APX	GPX	GST	GR	AsA	GSH	GSSG	$O_2^-$	$H_2O_2$	MDA	Si	SEV
SOD	-	0,38	<b>0,92</b>	<b>0,85</b>	<b>0,91</b>	<b>0,95</b>	<b>-0,97</b>	<b>-0,73</b>	<b>-0,86</b>	0,04	<b>0,96</b>	0,39	<b>0,85</b>	<b>0,96</b>	<b>0,97</b>
CAT	0,21	-	0,47	0,29	0,14	0,23	-0,30	-0,63	-0,12	0,22	0,42	0,31	0,02	0,15	0,24
POX	<b>0,85</b>	-0,17	-	<b>0,82</b>	<b>0,87</b>	<b>0,82</b>	<b>-0,88</b>	<b>-0,87</b>	<b>-0,86</b>	0,18	<b>0,98</b>	0,43	<b>0,72</b>	<b>0,88</b>	<b>0,90</b>
APX	0,50	-0,33	0,50	-	<b>0,81</b>	0,69	<b>-0,84</b>	-0,69	<b>-0,77</b>	-0,10	<b>0,84</b>	0,58	<b>0,82</b>	<b>0,79</b>	<b>0,90</b>
GPX	-0,46	0,01	-0,46	0,16	-	<b>0,89</b>	<b>-0,85</b>	<b>-0,77</b>	<b>-0,81</b>	0,09	<b>0,89</b>	0,58	<b>0,80</b>	<b>0,95</b>	<b>0,93</b>
GST	0,02	0,64	0,01	-0,01	-0,14	-	<b>-0,93</b>	-0,61	<b>-0,82</b>	0,11	<b>0,88</b>	0,30	<b>0,80</b>	<b>0,97</b>	<b>0,91</b>
GR	-0,52	<b>0,84</b>	-0,39	-0,58	0,29	0,38	-	0,61	<b>0,85</b>	-0,04	<b>-0,93</b>	-0,30	<b>-0,83</b>	<b>-0,93</b>	<b>-0,93</b>
AsA	-0,28	0,66	0,01	-0,39	-0,13	0,01	0,71	-	0,57	-0,25	<b>-0,81</b>	-0,70	-0,45	-0,65	-0,70
GSH	0,61	-0,70	0,56	0,64	-0,16	-0,24	<b>-0,88</b>	-0,69	-	-0,18	<b>-0,91</b>	<b>-0,14</b>	<b>-0,85</b>	<b>-0,91</b>	<b>-0,90</b>
GSSG	-0,28	0,55	-0,40	-0,63	-0,37	0,02	0,43	0,57	-0,56	-	0,21	0,19	-0,30	-0,04	-0,04
$O_2^-$	-0,23	0,69	-0,02	-0,56	-0,02	0,02	<b>0,82</b>	<b>0,92</b>	<b>-0,72</b>	0,54	-	0,39	<b>0,78</b>	<b>0,92</b>	<b>0,94</b>
$H_2O_2$	0,20	<b>0,84</b>	0,11	0,70	0,18	-0,45	<b>-0,84</b>	-0,68	0,67	-0,60	<b>-0,83</b>	-	0,17	0,33	0,40
MDA	-0,27	<b>0,88</b>	-0,41	-0,54	0,04	0,55	<b>0,82</b>	0,49	<b>-0,83</b>	0,62	0,60	<b>-0,78</b>	-	<b>0,89</b>	<b>0,93</b>
Si	0,57	<b>-0,84</b>	0,38	0,62	-0,09	-0,30	<b>-0,94</b>	<b>-0,85</b>	<b>0,89</b>	-0,62	<b>-0,87</b>	<b>0,95</b>	<b>-0,77</b>	-	<b>0,96</b>
SEV	<b>0,72</b>	-0,69	0,61	<b>0,77</b>	0,04	-0,31	<b>-0,78</b>	-0,64	<b>0,82</b>	<b>-0,73</b>	-0,63	<b>0,76</b>	-0,70	<b>0,88</b>	-

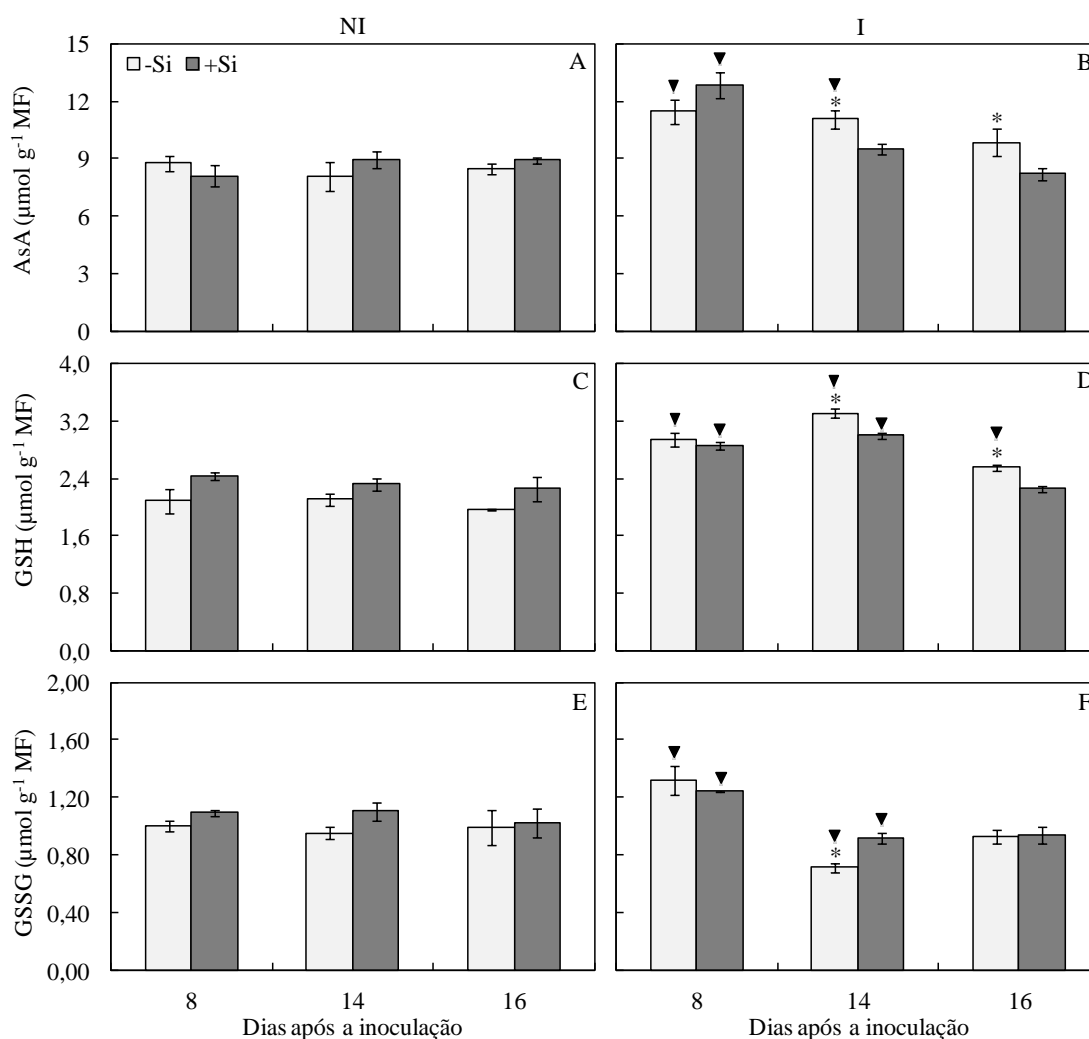
<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos pelo teste *t* ( $P \leq 0,05$ ).



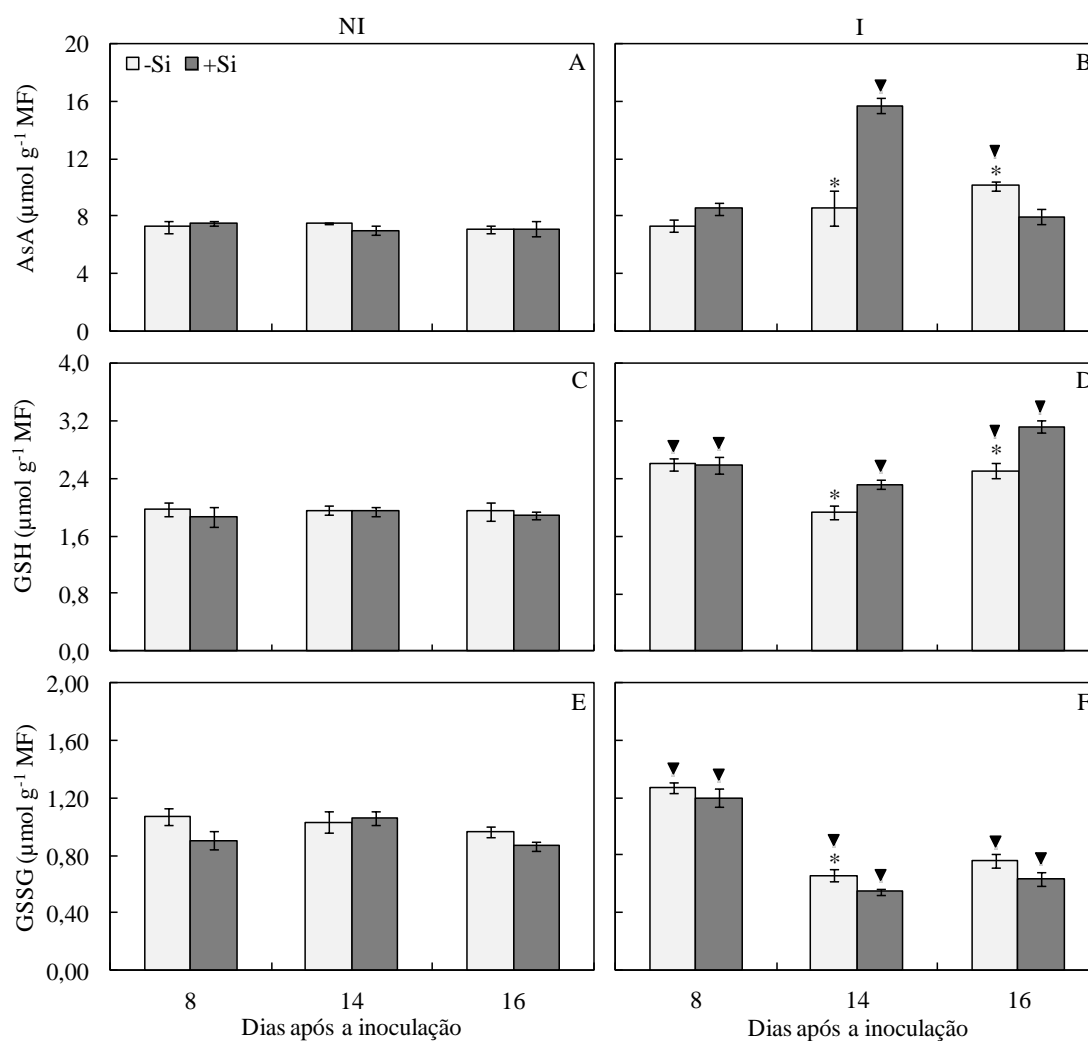
**Figura 2.** Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A, B), catalase (CAT) (C, D), peroxidase (POX) (E, F), peroxidase do ascorbato (APX) (G, H), peroxidase da glutaciona (GPX) (I, J), glutaciona-S-transferase (GST) (K, L) e redutase da glutaciona (GR) (M, N) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I, K, M) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J, L, N) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI e I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



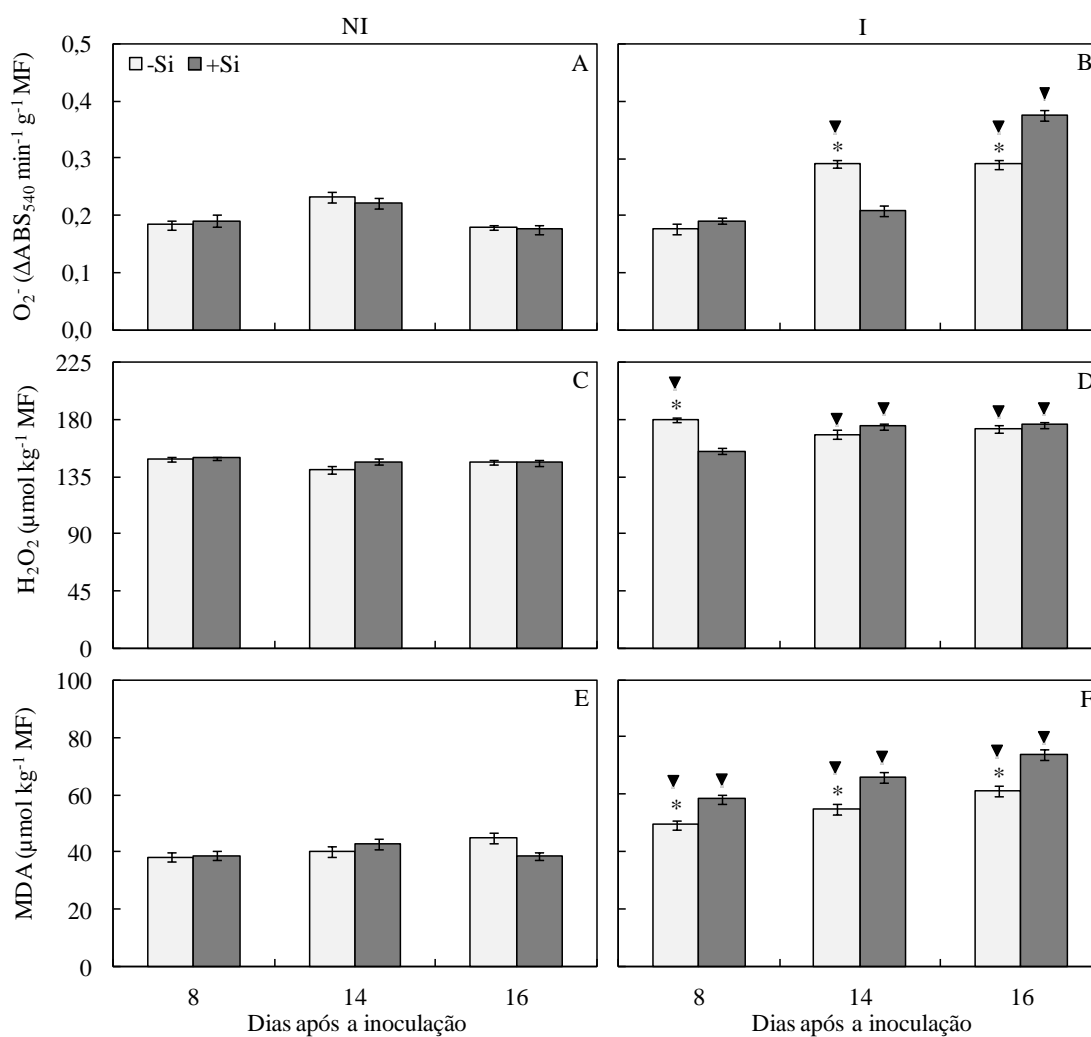
**Figura 3.** Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A, B), catalase (CAT) (C, D), peroxidase (POX) (E, F), peroxidase do ascorbato (APX) (G, H), peroxidase da glutaciona (GPX) (I, J), glutaciona-S-transferase (GST) (K, L) e redutase da glutaciona (GR) (M, N) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I, K, M) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J, L, N) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI e I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



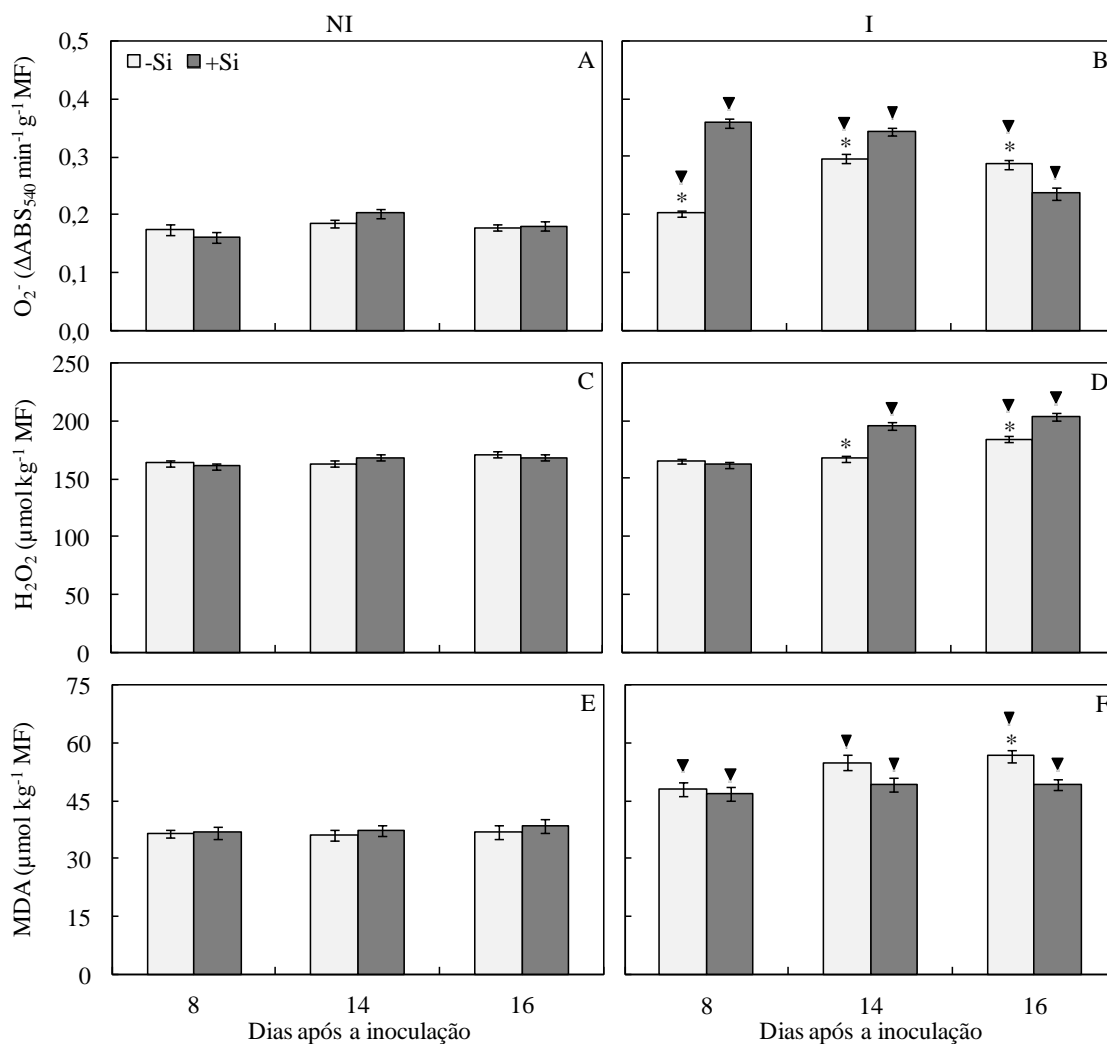
**Figura 4.** Concentrações de ascorbato (AsA) (A, B), glutathiona reduzida (GSH) (C, D) e glutathiona oxidada (GSSG) (E, F) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E) ou inoculadas (I) (B, D, F) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI ou I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 5.** Concentrações de ascorbato (AsA) (A, B), glutathiona reduzida (GSH) (C, D) e glutathiona oxidada (GSSG) (E, F) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E) ou inoculadas (I) (B, D, F) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI ou I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 6.** Concentrações de superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI ou I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 7.** Concentrações de superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de avaliação e tratamentos NI ou I, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo invertido (▼), dentro de cada época de avaliação e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.

## *Capítulo 2*

**Limitações fisiológicas em plantas de soja supridas com silício e infectadas por *Cercospora sojina***

## RESUMO

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das doenças mais importantes da soja, acarretando grandes perdas na produtividade devido à severa redução da área fotossinteticamente ativa. Considerando que o suprimento de plantas com silício (Si) propicia redução na limitação fisiológica imposta pela infecção por patógenos, neste estudo foi avaliado o efeito do Si nas trocas gasosas, nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, nas concentrações de pigmentos cloroplastídicos, das hexoses (glicose e frutose), da sacarose e do amido aos 8, 14 e 16 dias após a inoculação (dai) em plantas de soja das cvs. Bossier e Conquista, suscetível e resistente à mancha olho de rã, respectivamente, cultivadas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de Si (-Si e +Si, respectivamente) e inoculadas ou não com *C. sojina*. A severidade da mancha olho de rã aos 16 dai foi maior nas plantas da cv. Bossier, independentemente da presença do Si. Para as duas cultivares, maiores valores de severidade foram encontrados para as plantas do tratamento +Si em relação ao -Si, porém, de forma mais proeminente para a cv. resistente. Na ausência da inoculação com *C. sojina*, o Si não acarretou mudanças fisiológicas. No entanto, esse elemento desencadeou aumento na suscetibilidade de plantas de soja à mancha olho de rã, resultando em decréscimo mais pronunciado das trocas gasosas e na eficiência fotoquímica, bem como na concentração de pigmentos cloroplastídicos para a cv. suscetível. Para a cv. resistente, o efeito negativo da infecção por *C. sojina* sobre a fisiologia das plantas foi associado fundamentalmente à redução em  $g_s$ , independentemente do suprimento com Si. Além disso, a inoculação com *C. sojina* desencadeou, de modo geral, aumento nas hexoses para as duas cultivares e doses de Si, evidenciando que o incremento dessas moléculas pode ser uma estratégia de defesa das plantas de soja contra *C. sojina*. Uma vez que o aumento na suscetibilidade das plantas da cv. resistente mediado pelo Si não tenha sido suficiente para acarretar limitações fisiológicas, podemos inferir que a menor eficiência fotossintética observada para a cv. suscetível tenha ocorrido mediante redução acentada da área foliar fotossinteticamente ativa.

*Palavras chave:* fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, carboidratos, *Cercospora sojina* e *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

A cada ano, doenças causadas por bactérias, nematóides, vírus e particularmente fungos causam perdas imensuráveis na produtividade da cultura da soja. Um dos principais fungos de importância econômica que infecta folhas, caules, legumes e sementes de soja é *Cercospora sojina* K. Hara, agente causal da mancha olho de rã, o qual apresenta elevada capacidade de dispersão e grande variabilidade genética (Almeida *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2011). Nas folhas, os sintomas da mancha olho de rã iniciam-se como pequenas manchas de aspecto encharcado (Almeida *et al.*, 2005). Com a evolução dos sintomas, as lesões apresentam coloração castanho-claras no centro, com bordos castanho-avermelhados e cinza nas superfícies adaxial e abaxial, respectivamente (Almeida *et al.*, 2005). As lesões nas hastes e nos legumes inicialmente apresentam aspecto semelhante ao observado em folhas; no entanto, as lesões evoluem para manchas circulares de coloração castanho-escuras (Almeida *et al.*, 2005). No tegumento das sementes, a infecção por *C. sojina* acarreta rachaduras e lesões de coloração parda a cinza (Almeida *et al.*, 2005).

Em regiões de clima relativamente quente e úmido, tais como Argentina, Brasil, China, Nigéria e sul dos Estados Unidos, a mancha olho de rã pode resultar em drásticas reduções na produtividade da soja (Zhang, 2012; Scandiani *et al.*, 2012). Tal redução pode ser explicada pela redução da área fotossinteticamente ativa mediante a formação de inúmeras lesões necróticas com halos cloróticos, como consequência da ação de toxinas não específicas, além da indução da desfolha prematura (Mian *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Embora não haja relato sobre o efeito da infecção de plantas de soja por *C. sojina* sobre a fotossíntese, acredita-se que a mesma seja reduzida (Mian *et al.*, 2008).

A redução na fotossíntese é considerada um dos fatores mais importantes para explicar as perdas na produtividade acarretadas pela infecção por patógenos (Kumar *et al.*, 2013). Existem vários relatos na literatura sobre o efeito negativo de patógenos sobre a fotossíntese (Bastiaans e Roumen, 1993; Bassanezi *et al.*, 2002; Bilgin *et al.*, 2010; Dallagnol *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013). A redução na fotossíntese decorrente da infecção por patógenos pode ser devida a diferentes causas, como mudanças na resistência ao CO<sub>2</sub>, tanto estomática quanto mesofílica, alterações nas reações bioquímicas da fotossíntese e na estrutura dos cloroplastos, bem como repressão de genes envolvidos com o metabolismo primário (Pinkard e Mohammed, 2006; Bilgin *et al.*, 2010). Além disso, mudanças na emissão da fluorescência da

clorofila *a* também podem ser detectadas em plantas infectadas por patógenos (Rahoutei *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2011).

Embora seja amplamente reconhecido que o silício (Si) potencializa a defesa de plantas contra vários patógenos (Datnoff *et al.*, 2007), pouco se sabe a respeito do efeito desse elemento sobre os processos fisiológicos. Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que em plantas supridas com Si a limitação fisiológica imposta pela infecção por patógenos é reduzida. Resende *et al.* (2012), por exemplo, reportaram que plantas de sorgo supridas com Si apresentam menor decréscimo na taxa de fotossíntese (*A*), na condutância estomática ( $g_s$ ) e na transpiração (*E*) comparadas às plantas não supridas com esse elemento. Dallagnol *et al.* (2013) demonstraram que o aumento na concentração de Si foliar em plantas de arroz submetidas tanto a estresse biótico quanto abiótico resulta em menor comprometimento em *A*. Existem evidências de que o Si também esteja envolvido no incremento do processo de fotorrespiração em plantas submetidas a estresses (Nwugo e Huerta, 2011). Adicionalmente, esse elemento minimiza o decréscimo da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) em plantas de arroz infectadas por *Magnaporthe oryzae* (Gao *et al.*, 2011).

Atualmente, o controle da mancha olho de rã é feito com o uso de cultivares resistentes associado à aplicação de fungicidas (Missaoui *et al.*, 2007). Contudo, Zhang (2012) reportaram o surgimento de novos isolados de *C. soja* que apresentam redução na sensibilidade a fungicidas, fato que pode resultar em perdas severas na produtividade da soja. Dessa forma, o estudo de novas alternativas de controle da mancha olho de rã torna-se primordial. Considerando que o Si propicia benefícios agronômicos tanto para plantas monocotiledôneas quanto para dicotiledôneas, especialmente no que concerne ao controle de doenças causadas por fungos (Datnoff *et al.*, 2007), a hipótese deste trabalho foi de que os efeitos negativos decorrentes da infecção por *C. soja* sobre os processos fisiológicos de plantas de soja são reduzidos na presença de Si. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito do Si nas trocas gasosas, nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, nas concentrações de pigmentos cloroplastídicos, açúcares e amido em plantas infectadas ou não por *C. soja*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparo da solução nutritiva.** A solução nutritiva utilizada neste estudo foi preparada conforme descrito por Clark (1975) com algumas modificações, sendo constituída dos macronutrientes 1,04 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,8 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,069 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,931 mM  $\text{KCl}$  e 0,6 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e os seguintes micronutrientes 19  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 7  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 90  $\mu\text{M}$  EDTA. O Si foi suprido como ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, forma  $\text{H}^+$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma *et al.*, 2002). O Si foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mM (+Si).

**Crescimento das plantas.** Sementes de soja das cultivares Bossier e Conquista, suscetível e resistente a *C. sojina*, respectivamente (Gravina *et al.*, 2004; Juliatti *et al.*, 2006), foram esterilizadas por 3 min em solução de hipoclorito de sódio 10%, lavadas em água desionizada e germinadas em rolos de papel “germiteste” em uma câmara de germinação a 25°C. Após germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em vasos plásticos contendo solução nutritiva com 1/4 da força iônica da solução anteriormente citada, mas sem adição de Si. Após esse período, três plântulas foram transferidas para novos vasos plásticos com 5 L de solução nutritiva com a força iônica total, contendo ou não Si, sob contínua aeração. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias, e o pH da solução nutritiva foi verificado diariamente, o qual foi mantido entre 5,5 e 5,8. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ , a  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

**Preparo do inóculo.** O isolado de *C. sojina* (UFV-22), cedido pelo Prof. Tuneo Sedyama (Departamento de Fitotecnia da UFV), foi preservado em tiras de papel-filtro em sílica gel a 4°C. Dez dias antes da inoculação, pedaços dessas tiras foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após o crescimento micelial, discos de meio contendo o fungo foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio V8. As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h durante 7 dias. Após a indução da produção de conídios, foram adicionados 10 mL de água desionizada contendo gelatina 1% (m/v) em cada placa de Petri e os conídios foram cuidadosamente removidos com pincel de cerdas macias. A suspensão de conídios foi calibrada em hemacitômetro para uma concentração de  $4 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

**Procedimento de inoculação das plantas.** Após 20 dias da adição de Si na solução nutritiva, na superfície adaxial e abaxial de todas as folhas de cada planta (estádio V6) (Fehr *et al.*, 1971) foram pulverizados 20 mL da suspensão de conídios do isolado de *C. sojina* UFV-22 na concentração de  $4 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, utilizando-se um atomizador (VLS-Set Airbrush, Companhia Paache Airbrush, USA). Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmaras de crescimento de plantas (CCP), instaladas dentro da casa de vegetação, permanecendo até o final dos experimentos. As CCP, construídas de madeira, possuíam 2 m de largura, 1,5 m de altura, 5 m de comprimento e cobertura com plásticos de 100 µm de espessura. Dentro da CCP, a densidade máxima de fluxo de fótons na altura do dossel foi de aproximadamente 700 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e a temperatura foi de 25 ± 2°C e 20 ± 2°C durante o dia e noite, respectivamente. A umidade relativa foi mantida a 92 ± 3% mediante a um sistema de nebulização (NEB-100; KGF Companhia, São Paulo, Brasil), o qual foi programado para pulverizar névoa a cada 30 min acima da copa das plantas. A umidade relativa e a temperatura foram mensuradas com um termo-higrógrafo (TH-508, Impac, Brasil). As plantas inoculadas ou não inoculadas foram mantidas em câmaras separadas, porém sob as mesmas condições até o final do experimento.

**Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si.** Para a avaliação da severidade da doença aos 16 dai, selecionou-se a sexta folha, do ápice para a base, por essa apresentar maior severidade da doença. Para isto, as folhas foram digitalizadas em resolução de 600 dpi, e as imagens foram processadas utilizando-se o software Quant (Liberato, 2003). A porcentagem da área foliar com sintomas da mancha olho de rã foi considerada a estimativa da severidade pelo Quant (Seq). Após esse processo, essas folhas foram secas para a determinação da concentração foliar de Si, a qual foi realizada conforme descrito por Korndörfer *et al.* (2004).

**Determinação das trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.** Aos 8, 14 e 16 dai, realizaram-se as avaliações das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* no folíolo central da sexta folha das plantas. A taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*), a condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), a concentração interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) e a taxa de transpiração (*E*) foram estimadas utilizando-se um analisador portátil de gases no infravermelho (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA), operando em sistema aberto. As avaliações foram realizadas entre 9:00 e 12:00 h, sob irradiância de 1000 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e concentração externa de CO<sub>2</sub> de 400 µmol mol<sup>-1</sup>. Os parâmetros de

fluorescência da clorofila *a* também foram determinados por meio de um fluorômetro com pulso modulado (MINI-PAM) (Walz, Effeltrich, Germany) nos mesmos folíolos em que foram efetuadas as medições das trocas gasosas. Os folíolos, adaptados ao escuro por 30 min, foram inicialmente expostos a um pulso fraco de luz vermelho-distante ( $1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Posteriormente, um pulso de luz saturante de duração de 1 s, com irradiância de  $6.000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , foi aplicado para estimar a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). Logo após, as amostras foram iluminadas por 30 s com uma luz actínica contínua ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para a obtenção da fluorescência transiente ( $F_s$ ) sendo, em seguida, aplicados pulsos de luz branca saturante para a obtenção da fluorescência máxima ( $F_m'$ ). A luz actínica foi então desligada, e então aplicada luz vermelho-distante para a mensuração de  $F_0$  das plantas adaptadas à luz ( $F_0'$ ). A partir dessas variáveis, procedeu-se à estimativa da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ), do rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) e dos coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ). Para o cálculo da taxa de transporte de elétrons (ETR), foi considerado que o FSI e o FSII absorvem quantidades iguais de luz. Assim, a ETR foi estimada como  $\text{ETR} = [\text{RFA efetivamente interceptada pela folha}] \times [\text{absorbância foliar}] \times \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5$  (Stefanov e Terashima, 2008).

**Determinação das concentrações de clorofilas e carotenoides.** Discos foliares coletados aos 16 dai, correspondentes às áreas utilizadas para a determinação das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*, foram utilizados para a determinação de clorofilas (Cl) *a* e *b* e carotenoides (Car), que foram extraídos com acetona 85%, a 4°C, e quantificados conforme descrito por Lichtenthaler (1987).

**Determinação da concentração de carboidratos.** O quarto, quinto e sexto trifólios, a partir da base, das plantas de soja foram coletados aos 8, 14 e 16 dai para a determinação das concentrações de glicose (GLI), frutose (FRU), sacarose (SAC) e de amido (AMI), as quais foram determinadas conforme proposto por Trethewey *et al.* (1998).

**Avaliação das imagens de fluorescência da clorofila *a*.** Procedeu-se, ao fim do experimento, a avaliação da imagem da fluorescência da clorofila *a* utilizando-se o fluorômetro IMAGING-PAM e do software Imaging Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha) nos mesmos folíolos em que foram mensuradas as trocas gasosas e os parâmetros de fluorescência. Os folíolos, após serem adaptados ao escuro por 30

min, foram fixados em um suporte à distância de 18,5 cm de uma câmara IMAG-K4, resultando em imagens na resolução de  $640 \times 480$  pixels, que foram obtidas mediante a utilização de luz de mensuração de intensidade 2, frequência 1, pulso de saturação de intensidade 10, ganho 7 e perda 2. As imagens das variáveis  $F_v/F_m$ ,  $\Phi FSI$ ,  $qP$ ,  $NPQ$  e  $ETR$  foram obtidas a partir dos valores de  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_0'$  e  $F_m'$  conforme descrito por Behr *et al.* (2010). O tamanho da área amostrado dos folíolos das plantas dos tratamentos foi padronizado para 2,8 cm de largura e 2,9 cm de comprimento, com resolução de  $110 \times 160$  pixels.

**Delineamento experimental e análise estatística dos dados.** Para a avaliação de todas as variáveis deste estudo, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para determinar a concentração foliar de Si, foi utilizado o esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2$  consistindo de plantas supridas (+Si) ou não (-Si) com Si, duas cultivares de soja (Bossier e Conquista) e plantas inoculadas ou não com *C. soja*. A severidade da mancha olho de rã foi avaliada utilizando o esquema fatorial  $2 \times 2$  (plantas -Si ou +Si) e as duas cultivares de soja. Para os parâmetros fisiológicos foi utilizado o esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2 \times 3$  [plantas -Si ou +Si, inoculadas ou não, as duas cultivares de soja e três épocas de avaliação (8, 14 e 16 dai)]. Cada unidade experimental foi constituída de um vaso plástico de 5 L com três plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS

**Concentração foliar de Si.** Para a concentração de Si foliar, apenas o fator concentrações de Si foi significativo (Tabela 1). Houve maior concentração de Si nas folhas das plantas do tratamento +Si em relação às do tratamento -Si, independentemente da cultivar (Figura 1).

**Severidade da mancha olho de rã.** Os fatores cultivares e concentrações de Si isolados, bem como sua interação, foram significativos para a severidade da mancha olho de rã (Tabela 1). Houve menor severidade na cv. Conquista que na cv. Bossier, independentemente do suprimento com Si (Figura 2). Contudo, independentemente da cultivar observada, houve maior severidade nas plantas do tratamento +Si do que para as do -Si (Figura 2).

**Trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e concentração de carboidratos.**  $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i$ ,  $E$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi FSI$ ,  $qP$ ,  $NPQ$ ,  $ETR$ ,  $CLI$ ,  $FRU$ ,  $SAC$  e  $AMI$  foram significativamente influenciados por pelo menos um dos fatores estudados, bem como para algumas interações entre eles (Tabela 1). A interação dos fatores cultivares  $\times$  inoculação  $\times$  épocas de avaliação  $\times$  concentrações de Si foi significativa para  $A$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi FSI$ ,  $qP$ ,  $NPQ$ ,  $ETR$ ,  $GLI$  e  $FRU$  (Tabela 1).

Para as plantas não inoculadas de ambas as cultivares, de modo geral, não houve diferença entre os tratamentos -Si e +Si para todas as variáveis de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* analisadas, bem como para a concentração de carboidratos (Figura 3A, C, E e G; Figura 4A, C, E e G; Figura 5A, C, E, G e I; Figura 6A, C, E, G e I; Figura 8A, C, E e G; Figura 9A, C, E e G). Para as plantas inoculadas da cv. Bossier, houve menores valores de  $A$ ,  $E$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi FSI$ ,  $qP$  e  $ETR$  e maiores para  $NPQ$  aos 14 e 16 dai, além de menores valores de  $g_s$  e maior  $C_i$  aos 16 dai para o tratamento +Si em relação ao -Si (Figura 3B, D, F e H; Figura 5B, D, F, H e J). Houve maior concentração de  $GLI$  para as plantas inoculadas do tratamento +Si comparado com o tratamento -Si aos 8 dai (Figura 8B). A concentração de  $FRU$  foi maior para as plantas do tratamento +Si em relação ao -Si aos 8 dai, porém o inverso ocorreu aos 14 e 16 dai (Figura 8D). Houve menores concentrações de  $SAC$  aos 14 dai e de  $AMI$  aos 8 dai para as plantas do tratamento +Si comparadas às do tratamento -Si (Figura 8F e H). Para as plantas inoculadas da cv. Conquista, não houve diferença entre os tratamentos -Si e +Si para todas as variáveis de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* (Figura 4B, D, F e H; Figura 6B, D, F, H e J). Houve menor concentração de  $FRU$  para o tratamento +Si

do que para o tratamento -Si, independentemente da época de avaliação (Figura 9D). As concentrações de GLI e de SAC aos 16 dai e de AMI aos 8 dai foram maiores para as plantas do tratamento +Si comparado ao -Si (Figura 9B, F e H).

A inoculação da plantas da cv. Bossier com *C. sojina* resultou em redução em  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $\Phi$ FSII, qP e ETR aos 14 e aos 16 dai, e maior NPQ aos 8, 14 e 16 dai, independentemente do Si (Figura 3 A, B, C, D, G e H; Figura 5A, B, E, F, G, H, I e J). Plantas inoculadas apresentaram maior  $C_i$  em relação às não inoculadas apenas para o tratamento +Si aos 16 dai (Figura 3E e F). A concentração de GLI foi maior para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas, independentemente do Si (Figura 8A e B). Para FRU, maiores concentrações foram observadas para as plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai para o tratamento -Si e aos 8 dai para o tratamento +Si (Figura 8C e D). Plantas inoculadas apresentaram menor concentração de AMI do que as não inoculadas aos 14 e 16 dai para o tratamento -Si e aos 16 dai para o tratamento +Si (Figura 8G e H). Para a cv. Conquista, a inoculação das plantas acarretou redução em  $A$  aos 16 dai e em  $g_s$  e  $E$  aos 14 e 16 dai, independentemente do Si (Figura 4A, B, C, D, G e H). Menores valores de  $C_i$  ocorrem para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 16 dai para o tratamento +Si (Figura 4E e F). A fluorescência da clorofila  $a$  das plantas da cv. Conquista não foi alterada pela infecção por *C. sojina*, independentemente do Si (Figura 6A, B, C, D, E, F, G, H, I e J). A concentração de FRU foi maior nas plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai para o tratamento -Si e apenas aos 16 dai para o tratamento +Si (Figura 9C e D). Plantas inoculadas do tratamento +Si apresentaram menores concentrações de AMI aos 8, 14 e 16 dai e de SAC aos 8 e 16 dai e maior concentração de GLI aos 8 dai em relação às plantas não inoculadas (Figura 9A, B, E, F, G e H). Para o tratamento -Si, a inoculação das plantas resultou em incremento na concentração de GLI aos 8 e 16 dai e redução aos 14 dai (Figura 9A e B).

**Concentração de clorofilas e carotenoides.** Isoladamente, o fator inoculação foi o mais importante para explicar as variações nas concentrações de Cl e Car (Tabela 1). A interação dos fatores cultivares  $\times$  inoculação  $\times$  concentrações de Si foi significativa tanto para a concentração de Cl quanto de Car (Tabela 1). Para as plantas não inoculadas de ambas as cultivares, não houve diferença significativa entre os tratamento -Si e +Si nas concentrações dos pigmentos analisados (Figura 7A e C). Porém, para as plantas inoculadas, houve diferença significativa apenas para a cv. Bossier. Nesse caso, menores concentrações de Cl e Car foram encontradas no tratamento +Si em relação ao

-Si (Figura 7B). Quando o efeito da inoculação foi analisado, houve redução significativa na concentração dos pigmentos analisados apenas para a cv. Bossier, sendo os menores valores para as plantas inoculadas em relação às não inoculadas (Figura 7B).

**Imagens de fluorescência da clorofila *a*.** Para as plantas não inoculadas de ambas as cultivares, não houve diferença qualitativa no padrão de coloração entre os tratamentos -Si e +Si para as imagens de fluorescência de  $F_v/F_m$ ,  $\Phi F_{SII}$ , qP, NPQ e ETR (Figuras 10 e 11). No entanto, a inoculação das plantas da cv. Bossier usualmente resultou em decréscimo de  $F_v/F_m$ ,  $\Phi F_{SII}$ , qP e ETR e aumento de NPQ tanto para o tratamento -Si quanto para o +Si, porém de forma menos intensa para as plantas do tratamento -Si (Figura 10). Ressalta-se que nas áreas onde ocorreram coloração entre castanho-escuro e preta para  $F_v/F_m$ ,  $\Phi F_{SII}$ , qP, NPQ e ETR, possivelmente, ocorreu a perda da capacidade fotossintética, especialmente para o tratamento +Si (Figura 10). Para a cv. Conquista, não houve mudanças consideráveis de coloração para todas as variáveis de fluorescência, independentemente do Si (Figura 11).

**Correlação de Pearson.** Para a cv. Bossier, houve correlação positiva de  $A$  com  $g_s$ ,  $E$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi F_{SII}$ , qP, ETR, Cl, Car, e negativa com  $C_i$ , NPQ, concentração de Si foliar e severidade (Tabela 2). Os maiores valores de  $g_s$  correlacionaram-se positivamente com  $E$ , e negativamente com a concentração de Si foliar e severidade. O incremento de  $C_i$  esteve positivamente correlacionando com NPQ, concentração de Si foliar e severidade, e negativamente correlacionado com Cl e Car.  $E$  foi correlacionado positivamente com Car, e negativamente com a concentração de Si foliar e severidade. Houve correlação positiva de  $F_v/F_m$  com  $\Phi F_{SII}$ , qP, ETR, Cl e Car, e negativamente com NPQ, concentração de Si foliar e severidade. O  $\Phi F_{SII}$  foi positivamente correlacionado com qP, ETR e Car, e negativamente correlacionado com NPQ, concentração de Si foliar e severidade. O qP foi correlacionado positivamente com ETR e Car, e negativamente com NPQ, concentração de Si foliar e severidade. O NPQ foi correlacionado positivamente com a concentração de Si foliar e severidade, e negativamente com ETR, Cl e Car. Houve correlação positiva de ETR com Cl e Car, de Car com FRU, de AMI com a concentração de Si foliar, e dessa última com a severidade. Adicionalmente, ETR, Cl, Car e FRU foram correlacionados negativamente com a concentração de Si foliar e severidade. A concentração de GLI foi negativamente correlacionada com a concentração de AMI. Para a cv. Conquista, houve correlação positiva de  $g_s$  com  $C_i$  e  $E$ , de  $C_i$  com  $E$ , de Cl com a severidade, de GLI com FRU e SAC, de FRU com SAC, além

da correlação positiva entre a concentração de Si foliar e a severidade. Em adição, correlações negativas de Cl com GLI, de FRU com a concentração de Si foliar e de GLI e SAC com a concentração de Si foliar e a severidade.

## DISCUSSÃO

É sabido que a nutrição com Si potencializa a resistência de plantas de soja a estresses bióticos e abióticos (Arsenault-Labrecque *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2010a; Miao *et al.*, 2010). Além disso, o Si pode propiciar aumento na capacidade fotossintética de plantas de soja estressadas mediante, possivelmente, incremento na atividade de enzimas fotossintéticas e no conteúdo de pigmentos cloroplastídicos (Shen *et al.*, 2010b). No entanto, no presente estudo, o Si aumentou a suscetibilidade das plantas de soja ao fungo *C. sojina*, o que acarretou em redução na capacidade fotossintética da cv. suscetível, além de mudanças no metabolismo de carboidratos tanto para a cv. resistente quanto para a cv. suscetível. Além disso, os resultados do presente estudo evidenciaram que o suprimento com Si não acarretou mudanças fisiológicas em plantas de soja não inoculadas, tampouco modificou a concentração de carboidratos, independentemente da resistência da cultivar. Corroborando esses resultados, Resende *et al.* (2012) reportaram que o suprimento de Si a plantas de sorgo não desencadeou mudanças fisiológicas na ausência de estresse, o que foi evidenciado pela inalteração nas variáveis  $A$ ,  $g_s$  e  $E$ . Tomados em conjunto, estes resultados evidenciam que o efeito do Si sobre os processos fisiológicos em espécies como soja e sorgo seja limitado na ausência de estresse. Portanto, o aumento da suscetibilidade das plantas de soja a *C. sojina*, bem como o decréscimo na capacidade fotossintética mediante suprimento com Si não se deve a alterações na fotossíntese basal.

Existem vários relatos na literatura de que o ataque de plantas por patógenos resulta em redução em  $A$ , e a forma com que a fisiologia da planta é afetada pode variar de acordo com o patossistema estudado (Luque *et al.*, 1999; Bassanezi *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2011; Vélez *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2012). No presente estudo, o efeito negativo da infecção por *C. sojina* sobre a fisiologia de plantas da cultivar resistente foi associado fundamentalmente à redução em  $g_s$ . No entanto, a maior resistência estomática não foi suficiente para desencadear diferenças na taxa fotossintética entre as plantas supridas ou não com Si. Interessantemente, o decréscimo de  $C_i$  não foi relacionado com a taxa fotossintética nas plantas supridas com Si, o que evidencia que a maior severidade da mancha olho de rã desencadeada por esse elemento não foi suficiente para acarretar dano no aparato fotossintético nas plantas da cultivar resistente. Para as plantas da cultivar suscetível não supridas com Si, a infecção por *C. sojina* foi acompanhada por reduções em  $A$  fundamentalmente governadas por limitações estomáticas e decréscimo na concentração de clorofilas e carotenoides. Em

contrapartida, o suprimento de Si intensificou a suscetibilidade das plantas da cultivar suscetível a *C. soja* acarretando, conseqüentemente, redução na capacidade fotossintética mediante limitações estomáticas bem como bioquímicas, além do decréscimo na concentração de pigmentos cloroplastídicos. Suporte adicional para essa conclusão vem da correlação positiva de  $A$  com  $g_s$  e com as concentrações de  $Cl$  e  $Car$ , além da correlação negativa de  $A$  com  $C_i$  e concentração foliar de Si. Notadamente, reduções nos valores de  $g_s$  e  $E$  ocorreram, possivelmente, pelo descompasso hídrico resultante da colonização dos tecidos foliares por *C. soja*, uma vez que as áreas lesionadas por patógenos da espécie *Cercospora* spp. são mais suscetíveis à perda d'água comparadas às áreas sadias (Alderman e Beute, 1987).

Em adição, considerando que o aumento da infecção dos tecidos foliares por *C. soja* é proporcional ao aumento na concentração de toxinas não seletivas e, conseqüentemente, do incremento nas espécies reativas de oxigênio (EROs), assume-se que a redução dos pigmentos cloroplastídicos ocorrida para a cultivar suscetível se deu mediante intensa degradação oxidativa, a qual foi intensificada pelo suprimento com Si. Portanto, o decréscimo em  $A$  nas plantas da cultivar suscetível ocorreu, pelo menos em parte, em função da redução da interceptação da radiação solar acarretada pela redução dos pigmentos cloroplastídicos. Corroborando com esses resultados, a redução na concentração de clorofilas foi observada para plantas de tomateiro infectadas por *Botrytis cinerea* (Kuźniak e Skłodowska, 2001). Esse decréscimo, semelhante ao observado neste estudo, foi relacionado com aumento na concentração de EROs no tecido foliar (dados não mostrados).

A infecção das plantas da cultivar resistente não acarretou mudanças quantitativas na fluorescência da clorofila  $a$ . Em adição, as imagens de fluorescência da clorofila  $a$  dessa cultivar comprovam que o efeito negativo da inoculação foi restrito a pequenas áreas, o que é típico de interações incompatíveis entre patógenos e hospedeiros, conforme observado por Bastiaans e Roumen (1993) e Scharte *et al.* (2005). Notadamente, essas alterações pontuais não foram suficientes para desencadear mudanças no padrão de fluorescência da clorofila  $a$ . Tomados em conjuntos, estes resultados suportam que a infecção por *C. soja* não acarretou dano no aparato fotossintético para a cultivar resistente. De modo inverso, a mais provável causa relacionada com a redução em  $A$  desencadeada por *C. soja* na cultivar suscetível se deve ao comprometimento no aparato fotossintético, especialmente para as plantas supridas com Si. Essa afirmativa pode ser suportada pelo decréscimo na eficiência

fotoquímica do PSII ( $F_v/F_m$ ), a qual está relacionada com os menores valores de ETR. Adicionalmente, o intenso declínio em  $\Phi_{FSII}$  observado nas plantas infectadas indica que, de modo geral, a proporção de luz absorvida pelas clorofilas utilizada nos processos fotoquímicos foi reduzida. Além disso, a infecção das plantas por *C. soja* foi relacionada com a menor capacidade de re-oxidação do acceptor primário de elétrons ( $Q_A$ ), analisada através de qP, o qual estima a fração de centros de reação do PSII abertos (Schreiber *et al.*, 1994). Em conjunto com os dados de trocas gasosas, estes resultados indicam que a infecção na cultivar suscetível desencadeou redução na assimilação de  $CO_2$  e na regeneração de ADP e  $NADP^+$  e, conseqüentemente, excesso de energia de excitação, especialmente para as plantas supridas com Si. Embora parte dessa energia de excitação em excesso tenha sido dissipada na forma de calor, levando em conta que houve aumento de NPQ (Krause e Weis, 1991), isso não foi suficiente para evitar dano fotooxidativo no aparato fotossintético, o que pode ser comprovado pela redução em  $F_v/F_m$ , uma vez que essa variável evidencia a ocorrência de comprometimento na estrutura dos tilacoides. Suporte adicional a essa conclusão vem da correlação negativa de  $A$  com  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{FSII}$ , qP, ETR e positiva com NPQ, além das imagens de fluorescência da clorofila *a*. Por fim, as imagens de fluorescência da clorofila *a* comprovam que o efeito negativo do fungo *C. soja* sobre a fisiologia das plantas não foi restrito aos sítios de infecção para a cultivar suscetível, mas também em áreas aparentemente assintomáticas, o que se deu de forma mais pronunciada para as plantas supridas com Si, devido, possivelmente, à rápida difusão de toxinas não seletivas produzidas pelo fungo para os tecidos ainda não colonizados.

O efeito negativo da infecção por patógenos sobre a fisiologia das plantas tanto na área sintomática quanto na assintomática também foi reportado para outros patossistemas (Bastiaans, 1991; Rahoutei *et al.*, 2000; Pinkard e Mohammed, 2006; Berger *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2012; Gruber *et al.*, 2012). Porém, em contraste com os resultados do presente estudo, a relação positiva da concentração de Si com a eficiência fotoquímica, comprovada pelo menor decréscimo de  $F_v/F_m$ , e com a maior concentração de pigmentos cloroplastídicos foi relatada para o patossistema arroz-*Magnaporthe oryzae* (Gao *et al.*, 2011). Da mesma maneira, a infecção de plantas de arroz e sorgo por *Bipolaris oryzae* e *Colletotrichum sublineolum*, respectivamente, afetou negativamente a taxa fotossintética, porém de forma menos pronunciada para as plantas supridas com Si (Resende *et al.*, 2012; Dallagnol *et al.*, 2013). No entanto, considerando que um dos efeitos do Si sobre a resistência das plantas às doenças seja o

aumento na concentração de  $H_2O_2$  (Sun *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2011), além desse elemento estar envolvido no aumento da fotorrespiração (Van Bockhaven *et al.*, 2013), cujo processo também incrementa os níveis de  $H_2O_2$ , acredita-se que o fungo *C. soja* tenha se beneficiado pelo incremento nas EROs nas plantas supridas com Si, o que pode ter desencadeado maior comprometimento do aparato fotossintético.

Neste estudo, as reduções em *A* não foram associadas com as alterações em hexoses, SAC e AMI. Esses resultados podem ser suportados pela ausência de correlação entre *A* e as concentrações de carboidratos, independentemente da resistência da cultivar. Entretanto, considerando que o aumento na concentração de hexoses pode desencadear a ativação de genes envolvidos na defesa de plantas contra patógenos (Herbers *et al.*, 1996), o aumento dessas moléculas tanto para a cultivar resistente quanto para a suscetível indica que o incremento de carboidratos solúveis pode ser uma estratégia de defesa das plantas de soja contra *C. soja*. Essa hipótese pode ser suportada pelo fato de que a concentração de hexoses e SAC foi maior nas plantas da cultivar resistente não supridas com Si aos 16 dai, as quais apresentaram menor severidade da doença em relação às plantas supridas com esse elemento. A correlação negativa de GLI e SAC com a concentração foliar de Si e com a severidade, bem como a correlação negativa de FRU com a concentração foliar de Si para a cultivar resistente são suportes adicionais à essa hipótese.

Considerando que o aumento na suscetibilidade das plantas da cv. resistente mediado pelo Si não tenha sido suficiente para acarretar limitações fisiológicas, podemos inferir que a menor eficiência fotossintética observada nas plantas da cv. suscetível tenha ocorrido em função da intensa redução da área foliar fotossinteticamente ativa pela formação de inúmeras áreas cloróticas e necróticas. Isso, possivelmente, ocorreu via aumento na concentração intracelular de EROs oriundos de toxinas produzidas pelo patógeno. No entanto, a realização de novos estudos fisiológicos e moleculares nos ajudará a melhor elucidar as causas inerentes ao efeito negativo do suprimento de Si aos processos fisiológicos de plantas de soja infectadas por *C. soja*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderman SC, Beute MK. (1987) Influence of temperature, lesion water potencial, and cyclic wet-dry periods on sporulation of *Cercospora arachidicola* on peanut. *Phytopathology* 77: 960-963.
- Almeida AMR, Ferreira JT, Yorinori JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC. (2005) Doenças da soja (*Glycine max*). In: Doenças das Plantas Cultivadas, pg. 574, Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin A, Camargo LEA. (Eds). Editora Agronômica.
- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC. (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1831-1839.
- Arsenault-Labrecque G, Menzies JG, Bélanger RR. (2012) Effect of silicon absorption on soybean resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in different cultivars. *Plant Disease* 96: 37-42.
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Berger RD. (2002) Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Journal of Phytopathology* 150: 37-47.
- Bastiaans L, Roumen EC. (1993) Effect on leaf photosynthesis rate by leaf blast for rice cultivars with different types and levels of resistance. *Euphytica* 66: 81-87.
- Bastiaans L. (1991) Ratio between virtual and visual lesions size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* 81: 611-615.
- Behr M, Humbeck K, Hause G, Deising HB, Wirsig SGR. (2010) The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 879-892.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. (2007) Plant physiology meets phytopatology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58: 4019-4026.
- Bilgin DD, Zavala JA, Steven JZ, Clough SJ, Ort DR. (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment* 33: 1597-1613.
- Clark RB. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural Food Chemistry* 23: 458-460.

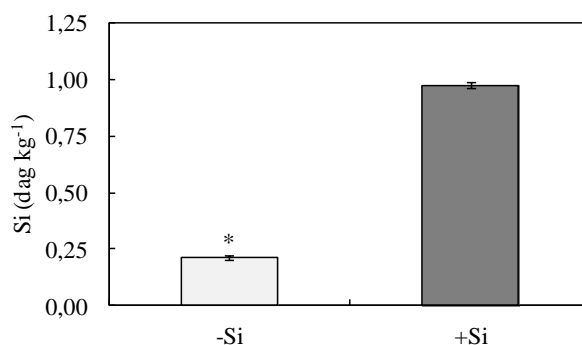
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Chaves ARM, Vale FXR, DaMatta FM. (2013) Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicon uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* 62: 120-129.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold K. (2007) Silicon and Plant Disease. In: Mineral Nutrition and Plant Disease, (pp. 233-246). Eds LE Datnoff, WE Elmer and DM Huber. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929-931.
- Gao D, Cai K, Chen J, Luo S, Zeng R, Yang JZX. (2011) Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in Magnaporthe oryzae infected rice plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 675-682.
- Gravina GA, Sedyama CS, Martins SF, Moreira MA, Cruz CD. (2004) Multivariate analysis of combining ability for soybean resistance to *Cercospora sojina* Hara. *Genetics and Molecular Biology* 27: 395-399.
- Gruber BR, Kruger EL, McManus PS. (2012) Effects of cherry leaf spot on photosynthesis in tart cherry ‘Montmorency’ foliage. *Phytopathology* 102: 656-661.
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U. (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793: 803.
- Juliatti FC, Hamawaki OT, Cunha EPC, Polizel AC, Santos MA, Shigihara D. (2006) Severidade de doenças fúngicas foliares em genótipos de soja em três locais de plantio. *Bioscience Journal* 22: 83-89.
- Kim J-S, Lee Y-S, Kim S-K, Kim KD, Kim J-W. (2011) Differential responses of soybean cultivars to *Cercospora sojina* isolates, the causal agent of frog-eye leaf spot in Korea. *The Plant Pathology Journal* 27: 183-186.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 24 pp.
- Krause GH, Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Kumar A, Guha A, Bimolata W, Reddy AR, Laha GS, Sundaram RM, Pandey MK, Ghazi IA. (2013) Leaf gas exchange physiology in rice genotypes infected with bacterial blight: An attempt to link photosynthesis with disease severity and rice yield. *Australian Journal of Crop Science* 7: 32-39.

- Kuźniak E, Skłodowska M. (2001) Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Science* 160: 723-731.
- Liberato JR. (2003) Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- Lichthenthaler HK. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Luque J, Cohen M, Savé R, Biel C, Álvarez IF. (1999) Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Annals of Forest Science* 56: 19-26.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130: 2111-2117.
- Mian MAR, Missaoui AM, Walker DR, Phillips DV, Boerma HR. (2008) Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science* 48: 14-24.
- Miao B-H, Han X-G, Zhang W-H. (2010) The ameliorative effect of silicon on soybean seedlings grown in potassium-deficient medium. *Annals of Botany* 105: 967-973.
- Missaoui AM, Ha BK, Phillips DV. (2007) Boerma, H.R. Single nucleotide polymorphism detection of the *Rcs3* gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science* 47: 1681-1690.
- Nwugo CC, Huerta AJ. (2011) The effect of silicon on the leaf proteome of rice (*Oryza sativa* L.) plants under cadmium-stress. *Journal of Proteome Research* 10: 518-528.
- Pinkard EA, Mohammed CL. (2006) Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-127.
- Rahoutei J, García-Luque I, Barón M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiology Plantarum* 110: 286-292.
- Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira WR, Chaves ARM, DaMatta FM. (2012) Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102: 892-898.
- Scandiani M, Ferri M, Ferrari B, Carmona M, Luque A, Balatti P. (2012) First report of races 11 and 12 of *Cercospora sojina*, the causal agent of soybean frogeye leaf spot, in Argentina. *Plant Disease* 96: 1067.

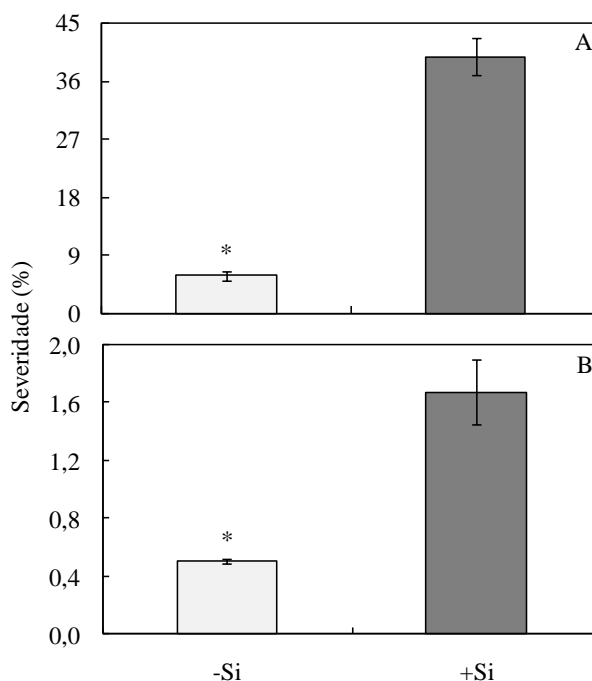
- Scharte J, Schön H, Weis E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell and Environment* 28: 1421-1435.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator of rapid assessment of in vivo photosynthesis. In Schulze E-D M, Caldwell MM (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*, Springer-Verlag, Berlin pp. 49-70.
- Shen X, Li X, Li Z, Li J, Duan L, Eneji AE. (2010a) Growth, physiological attributes and antioxidant enzyme activities in soybean seedlings treated with or without silicon under UV-B radiation stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 431-439.
- Shen X, Zhou Y, Duan L, Li Z, Eneji AE, Li J. (2010b) Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology* 167: 1248-1252.
- Shetty R, Fretté X, Jensen B, Shetty NP, Jensen JD, Jørgensen HJL, Newman M-A, Christensen L P. (2011) Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. *Plant Physiology* 157: 2194-2205.
- Stefanov D, Terashima I. (2008) Non-photochemical loss in PSII in high and low light-grown leaves of *Vicia faba* quantified by several fluorescence parameter including  $L_{NP}$ ,  $F_0/F_m'$ , a novel parameter. *Physiologia Plantarum* 133: 327-338.
- Sun W, Zhang J, Fan Q, Xu G, Li Z, Liang Y. (2010) Silicon-enhanced resistance to rice blast is attributed to silicon-mediated defence resistance and its role as physical barrier. *European Journal Plant Pathology* 128: 39-49.
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L. (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tuber leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *The Plant Journal* 15: 109-118.
- Van Bockhaven J, De Vleeschauwer D, Höfte M. (2013) Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany* 64: 1281-1293.
- Vélez ML, Silva PV, Troncoso OA, Greslebin AG. (2012) Alteration of physiological parameter of *Austrocedrus chilensis* by the pathogen *Phytophthora austrocedrae*. *Plant Pathology* 61: 877-888.

Zhang G. (2012) *Cercospora sojina*: over-winter survival and fungicide resistance. Urbana, Illinois, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dissertation.

## TABELAS E FIGURAS



**Figura 1.** Concentração foliar de silício (Si) das plantas de soja crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) considerando a média das cvs. Bossier e Conquista e das plantas não inoculadas e inoculadas com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*) são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



**Figura 2.** Severidade da mancha olho de rã em folíolos de plantas de soja das cvs. Bossier (A) e Conquista (B) crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) aos 16 dias após a inoculação com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*) são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

**Tabela 1.** Análise de variância dos efeitos de cultivares (C), inoculação das plantas (I), épocas de avaliação (EA) e concentrações de silício (Si) na concentração foliar de silício (CFSi), severidade da mancha olho de rã (SEV), concentrações de clorofilas (Cl) e carotenoides (Car), taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), concentrações de glicose (GLI), frutose (FRU), sacarose (SAC) e amido (AMI), eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi$ FSII), coeficiente de extinção fotoquímica (qP), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

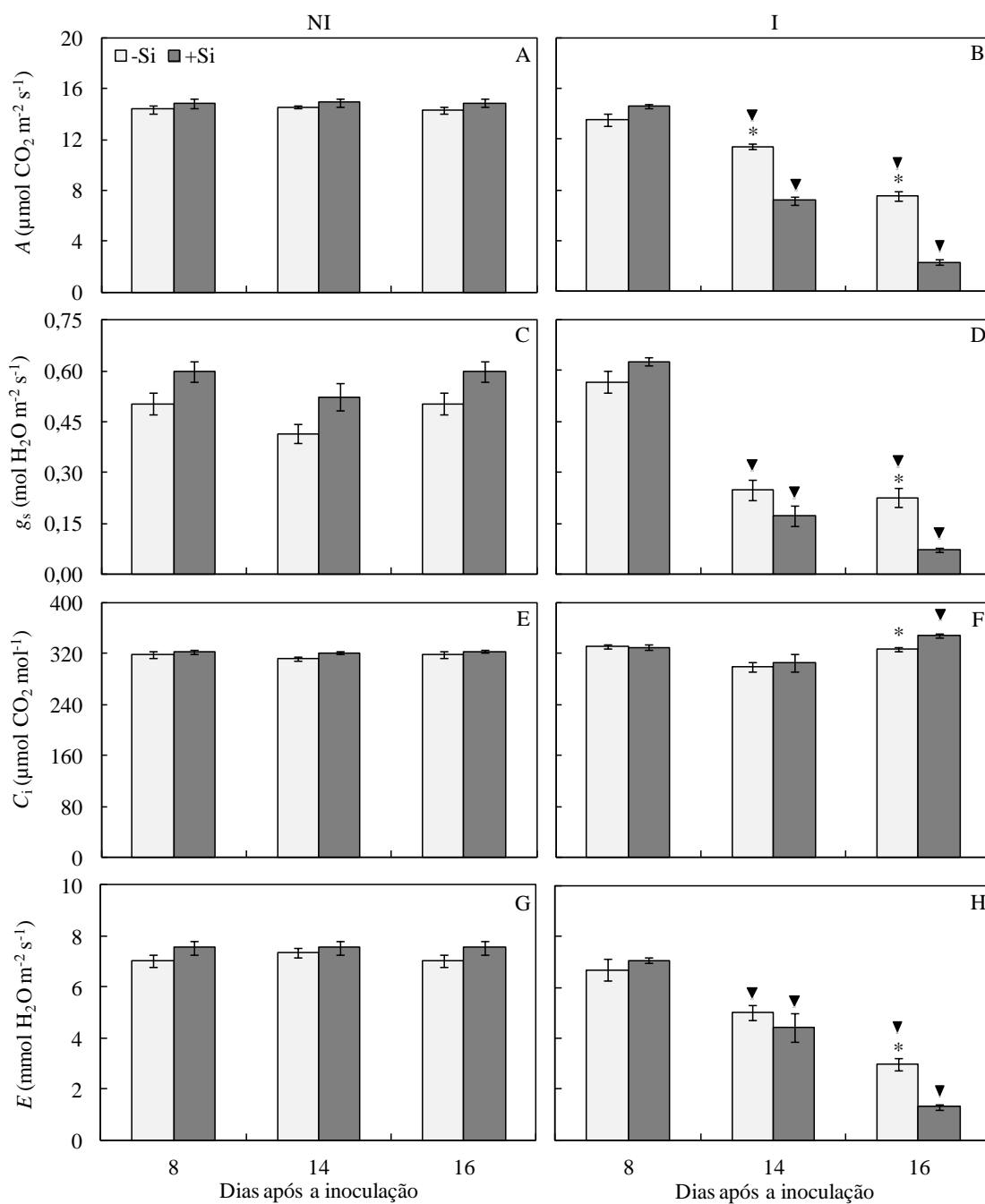
Causas de variação	Valores de $F^z$																
	CFSi	SEV	Cl	Car	A	$g_s$	$C_i$	$E$	GLI	FRU	SAC	AMI	$F_v/F_m$	$\Phi$ FSII	qP	NPQ	ETR
C	1,8	<b>203,0</b>	0,1	<b>9,5</b>	<b>410,0</b>	<b>89,3</b>	0,4	0,1	1,3	<b>6,1</b>	<b>5,9</b>	1,6	<b>109,5</b>	<b>120,1</b>	<b>126,9</b>	<b>102,6</b>	<b>58,3</b>
I	0,7	-	<b>57,8</b>	<b>18,0</b>	<b>436,7</b>	<b>197,4</b>	0,2	<b>286,4</b>	<b>105,1</b>	<b>177,8</b>	3,9	<b>32,4</b>	<b>19,3</b>	<b>41,2</b>	<b>32,0</b>	<b>273,5</b>	<b>122,6</b>
EA	-	-	-	-	<b>187,4</b>	<b>110,3</b>	<b>21,5</b>	<b>130,7</b>	3,0	<b>13,5</b>	1,2	1,4	0,9	<b>19,9</b>	<b>21,6</b>	<b>51,1</b>	<b>26,1</b>
Si	<b>2030,0</b>	<b>132,9</b>	<b>4,6</b>	3,0	<b>13,3</b>	0,8	1,7	0,3	1,8	<b>27,6</b>	0,1	1,5	<b>32,2</b>	2,5	<b>8,2</b>	<b>18,1</b>	<b>4,9</b>
C × I	0,1	-	<b>29,1</b>	<b>20,1</b>	<b>232,7</b>	<b>13,1</b>	<b>5,6</b>	<b>32,4</b>	<b>10,2</b>	<b>27,0</b>	1,0	<b>4,8</b>	<b>83,7</b>	<b>35,2</b>	<b>85,3</b>	<b>239,2</b>	<b>108,3</b>
C × EA	-	-	-	-	<b>30,2</b>	<b>7,4</b>	<b>5,0</b>	2,0	2,4	<b>17,4</b>	0,6	1,1	<b>19,7</b>	<b>27,3</b>	<b>18,1</b>	<b>53,3</b>	<b>38,9</b>
C × Si	0,5	<b>115,9</b>	<b>21,2</b>	<b>14,6</b>	<b>18,8</b>	0,9	<b>6,6</b>	0,2	2,2	<b>9,0</b>	2,2	0,1	<b>37,9</b>	<b>7,9</b>	<b>8,8</b>	<b>10,4</b>	<b>8,2</b>
I × EA	-	-	-	-	<b>120,6</b>	<b>71,2</b>	<b>3,4</b>	<b>71,2</b>	<b>4,7</b>	<b>17,6</b>	0,8	3,0	<b>25,7</b>	<b>18,8</b>	<b>10,1</b>	<b>30,0</b>	<b>24,0</b>
I × Si	0,1	-	3,2	0,4	<b>32,7</b>	<b>18,5</b>	0,7	<b>5,0</b>	2,3	<b>14,4</b>	<b>12,9</b>	<b>5,8</b>	<b>25,7</b>	2,2	3,9	<b>25,0</b>	<b>6,9</b>
EA × Si	-	-	-	-	<b>15,1</b>	2,9	0,2	<b>3,3</b>	<b>15,5</b>	3,0	0,7	0,5	<b>13,5</b>	0,1	2,2	<b>3,2</b>	1,2
C × I × EA	-	-	-	-	<b>53,7</b>	<b>9,9</b>	<b>10,6</b>	<b>7,6</b>	<b>4,0</b>	<b>9,5</b>	0,8	2,1	<b>17,6</b>	<b>16,6</b>	<b>9,1</b>	<b>42,7</b>	<b>33,3</b>
C × I × Si	0,3	-	<b>5,0</b>	<b>5,7</b>	<b>30,0</b>	<b>6,1</b>	2,3	<b>4,4</b>	<b>5,8</b>	<b>5,8</b>	2,2	3,8	<b>49,7</b>	<b>4,1</b>	<b>7,1</b>	<b>15,1</b>	1,6
C × EA × Si	-	-	-	-	<b>8,1</b>	1,3	1,6	0,4	<b>6,0</b>	<b>13,3</b>	2,4	0,1	<b>9,9</b>	2,2	1,2	<b>5,9</b>	0,9
I × EA × Si	-	-	-	-	<b>9,0</b>	<b>3,7</b>	0,2	3,0	<b>12,3</b>	<b>3,9</b>	1,2	2,0	<b>9,4</b>	2,8	<b>6,5</b>	<b>4,5</b>	2,3
C × I × EA × Si	-	-	-	-	<b>13,9</b>	0,8	2,2	0,5	<b>4,2</b>	<b>13,0</b>	1,2	2,2	<b>11,6</b>	<b>3,4</b>	<b>3,8</b>	<b>3,5</b>	1,8

<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ).

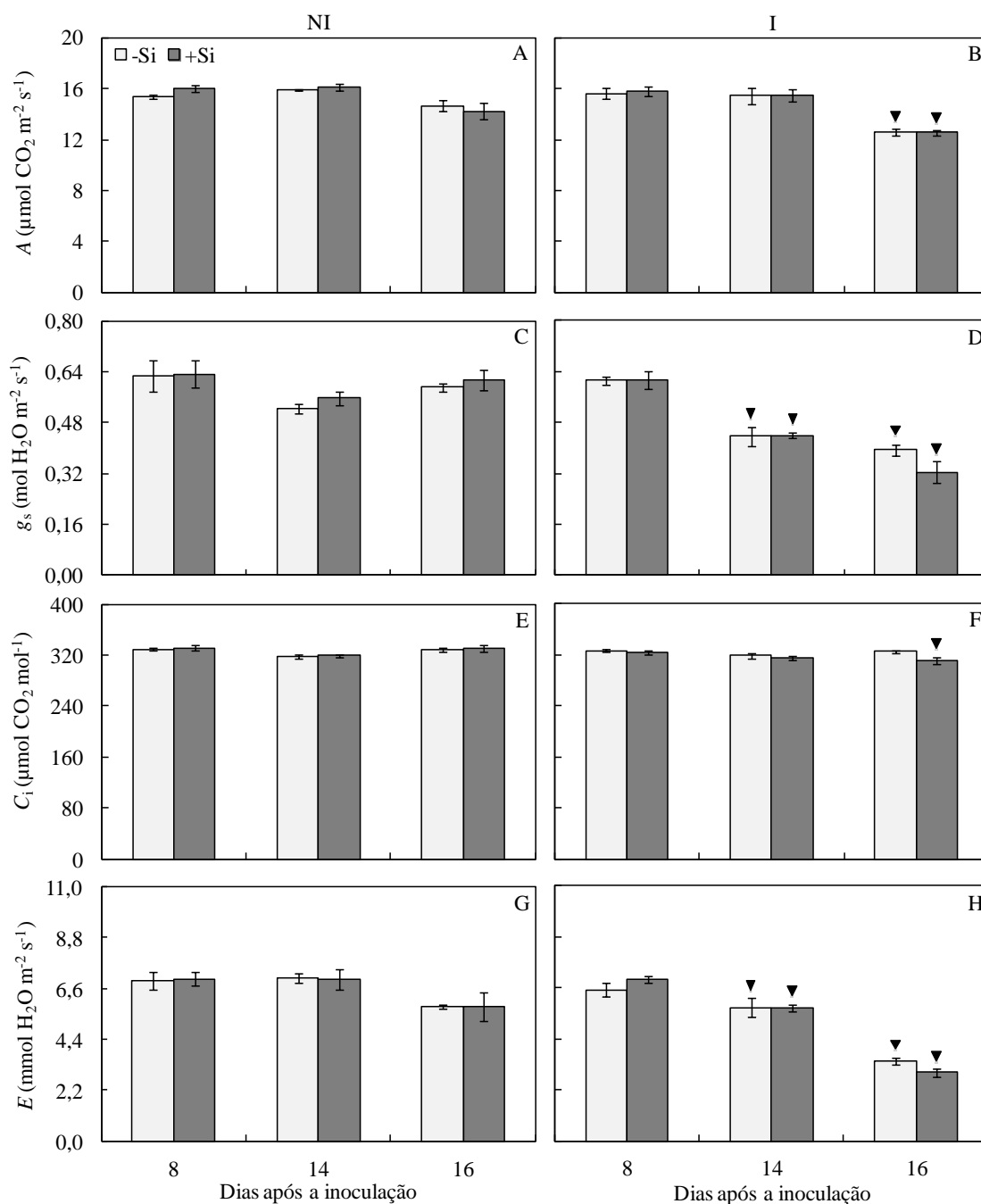
**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Pearson para as cvs. Bossier (acima da diagonal) e Conquista (abaixo da diagonal) entre as variáveis taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), concentração interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*), taxa de transpiração (*E*), eficiência fotoquímica máxima do FSII (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi$ FSII), coeficiente de extinção fotoquímica (*qP*), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (*ETR*), concentrações de clorofilas (*Cl*), carotenoides (*Car*), glicose (*GLI*), frutose (*FRU*), sacarose (*SAC*), amido (*AMI*) e silício (*Si*) e severidade da mancha olho de rã (*SEV*) em folíolos de plantas de soja crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício e inoculadas com *Cercospora sojina* aos 16 dias após a inoculação.

Variáveis <sup>z</sup>	<i>A</i>	<i>g<sub>s</sub></i>	<i>C<sub>i</sub></i>	<i>E</i>	<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>	$\Phi$ FSII	<i>qP</i>	NPQ	<i>ETR</i>	<i>Cl</i>	<i>Car</i>	<i>GLI</i>	<i>FRU</i>	<i>SAC</i>	<i>AMI</i>	<i>Si</i>	<i>SEV</i>
<i>A</i>	-	<b>0,96</b>	<b>-0,86</b>	<b>0,98</b>	<b>0,85</b>	<b>0,96</b>	<b>0,95</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,96</b>	<b>0,81</b>	<b>0,90</b>	0,30	0,61	-0,03	0,25	<b>-0,95</b>	<b>-0,96</b>
<i>g<sub>s</sub></i>	0,48	-	-0,70	<b>0,99</b>	<b>0,82</b>	<b>0,98</b>	<b>0,96</b>	<b>-0,84</b>	<b>0,93</b>	0,64	<b>0,75</b>	0,41	0,46	0,07	0,18	<b>-0,89</b>	<b>-0,90</b>
<i>C<sub>i</sub></i>	0,19	<b>0,92</b>	-	<b>-0,75</b>	-0,70	<b>-0,75</b>	-0,71	<b>0,94</b>	<b>-0,79</b>	<b>-0,90</b>	<b>-0,99</b>	0,01	-0,70	0,12	-0,40	<b>0,88</b>	<b>0,88</b>
<i>E</i>	0,35	<b>0,95</b>	<b>0,91</b>	-	<b>0,85</b>	<b>0,98</b>	<b>0,96</b>	<b>-0,88</b>	<b>0,93</b>	0,69	<b>0,80</b>	0,37	0,50	0,02	0,21	<b>-0,91</b>	<b>-0,92</b>
<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>	0,02	-0,16	-0,26	-0,22	-	<b>0,87</b>	<b>0,82</b>	<b>-0,78</b>	<b>0,79</b>	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>	0,20	0,63	-0,47	0,11	<b>-0,81</b>	<b>-0,91</b>
$\Phi$ FSII	-0,56	-0,56	-0,49	-0,48	0,55	-	<b>0,97</b>	<b>-0,86</b>	<b>0,90</b>	0,68	<b>0,79</b>	0,24	0,58	-0,01	0,32	<b>-0,94</b>	<b>-0,94</b>
<i>qP</i>	-0,47	-0,59	-0,40	-0,48	-0,55	-0,04	-	<b>-0,80</b>	<b>0,90</b>	0,69	<b>0,75</b>	0,21	0,60	0,05	0,34	<b>-0,91</b>	<b>-0,90</b>
NPQ	-0,40	-0,06	0,13	-0,01	0,05	0,62	-0,17	-	<b>-0,84</b>	<b>-0,81</b>	<b>-0,94</b>	-0,21	-0,53	0,01	-0,25	<b>0,89</b>	<b>0,90</b>
<i>ETR</i>	-0,38	0,01	0,01	-0,09	-0,08	-0,06	0,19	-0,34	-	<b>0,81</b>	<b>0,86</b>	0,42	0,61	-0,08	0,13	<b>-0,90</b>	<b>-0,93</b>
<i>Cl</i>	0,50	0,07	-0,05	-0,17	0,51	0,05	-0,60	0,18	-0,32	-	<b>0,95</b>	0,03	<b>0,83</b>	-0,39	0,22	<b>-0,80</b>	<b>-0,87</b>
<i>Car</i>	0,42	-0,34	-0,56	-0,40	-0,26	-0,29	0,15	-0,42	-0,10	0,14	-	0,08	<b>0,74</b>	-0,20	0,32	<b>-0,90</b>	<b>-0,92</b>
<i>GLI</i>	-0,24	0,31	0,44	0,50	-0,50	-0,36	0,45	-0,28	0,25	<b>-0,86</b>	-0,39	-	-0,37	0,08	<b>-0,75</b>	-0,05	-0,15
<i>FRU</i>	0,02	0,59	0,66	0,76	-0,20	-0,32	0,02	-0,20	0,03	0,59	-0,57	<b>0,88</b>	-	-0,44	0,57	<b>-0,75</b>	<b>-0,76</b>
<i>SAC</i>	0,06	0,66	0,65	0,79	-0,46	-0,44	0,02	-0,25	0,30	-0,67	-0,31	<b>0,85</b>	<b>0,86</b>	-	0,21	0,07	0,24
<i>AMI</i>	-0,34	0,39	0,53	0,26	-0,06	0,10	-0,18	0,45	0,50	0,10	-0,62	0,05	0,08	0,19	-	<b>0,97</b>	-0,32
<i>Si</i>	-0,04	-0,56	-0,64	-0,65	0,61	0,34	-0,21	-0,07	-0,10	0,52	0,42	<b>-0,76</b>	<b>-0,75</b>	<b>-0,82</b>	-0,37	-	<b>0,92</b>
<i>SEV</i>	0,22	-0,23	-0,34	-0,40	0,61	0,08	-0,44	-0,14	-0,16	<b>0,73</b>	0,34	<b>-0,77</b>	0,65	<b>-0,75</b>	-0,25	<b>0,92</b>	-

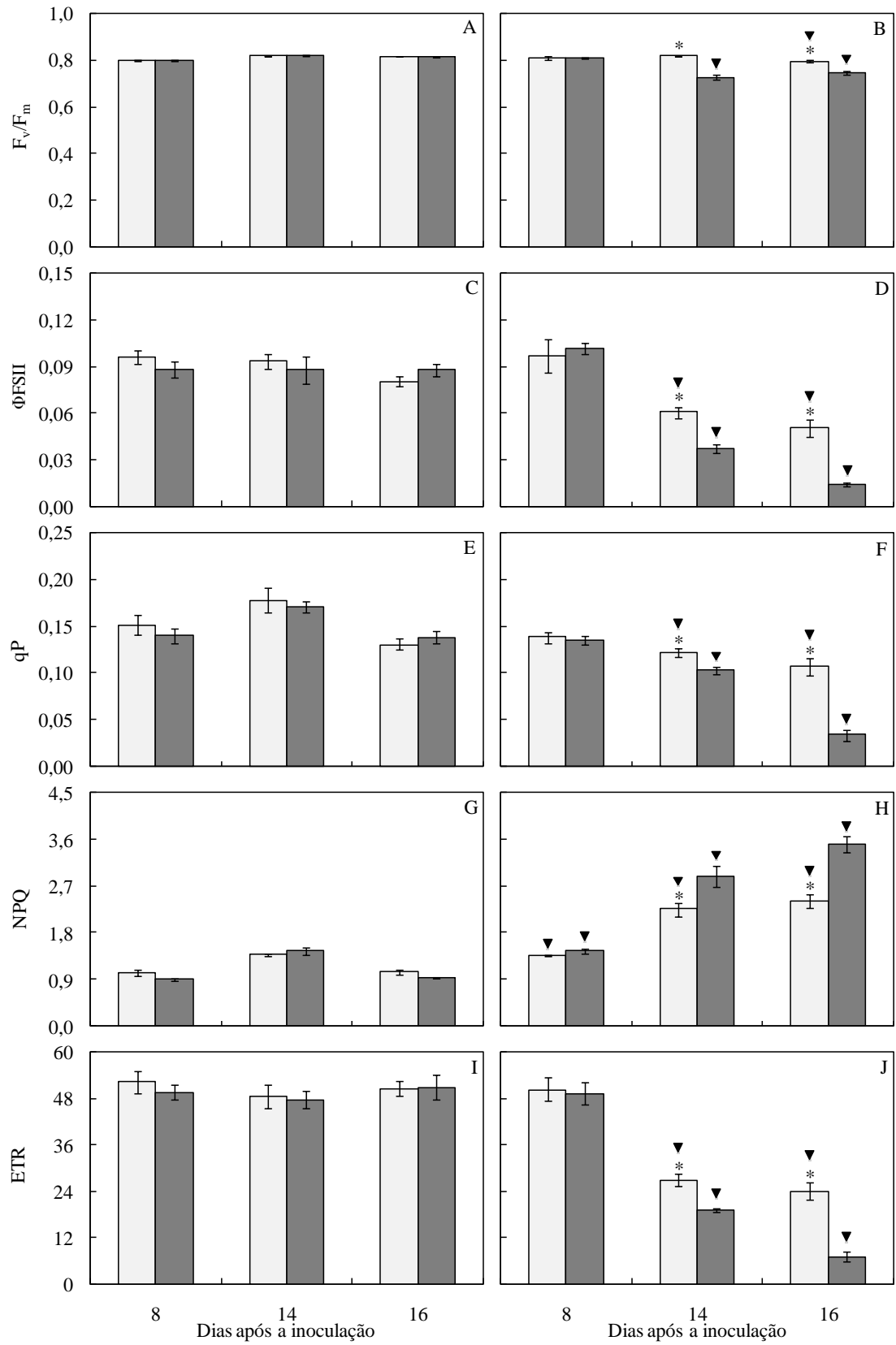
<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos pelo teste *t* ( $P \leq 0,05$ )



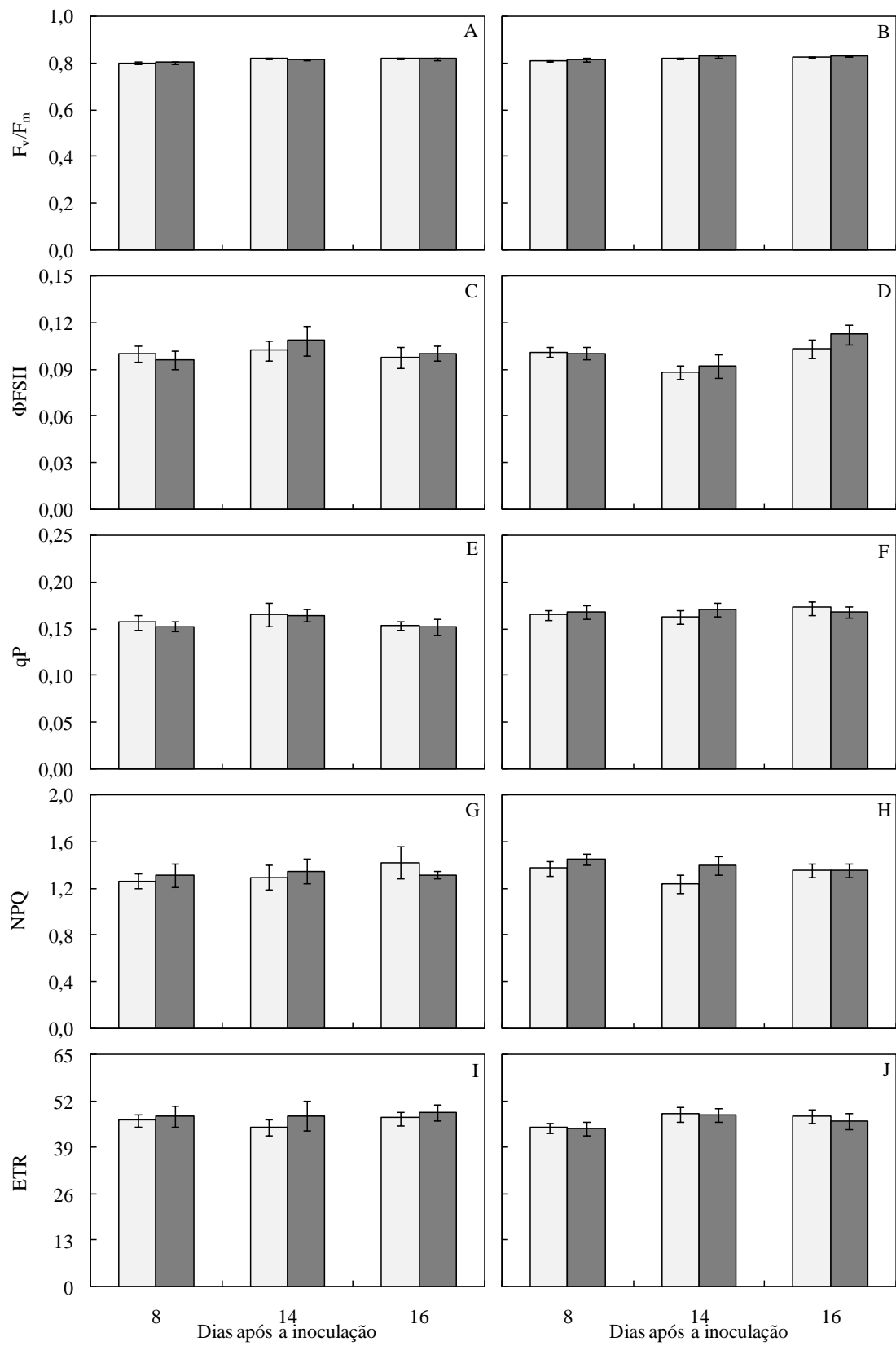
**Figura 3.** Taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) (A, B), condutância estomática (g<sub>s</sub>) (C, D), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) (E, F) e taxa de transpiração (E) (G, H) em folíolos de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G) ou inoculadas (I) (B, D, F, H) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste *t* ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste *t* ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



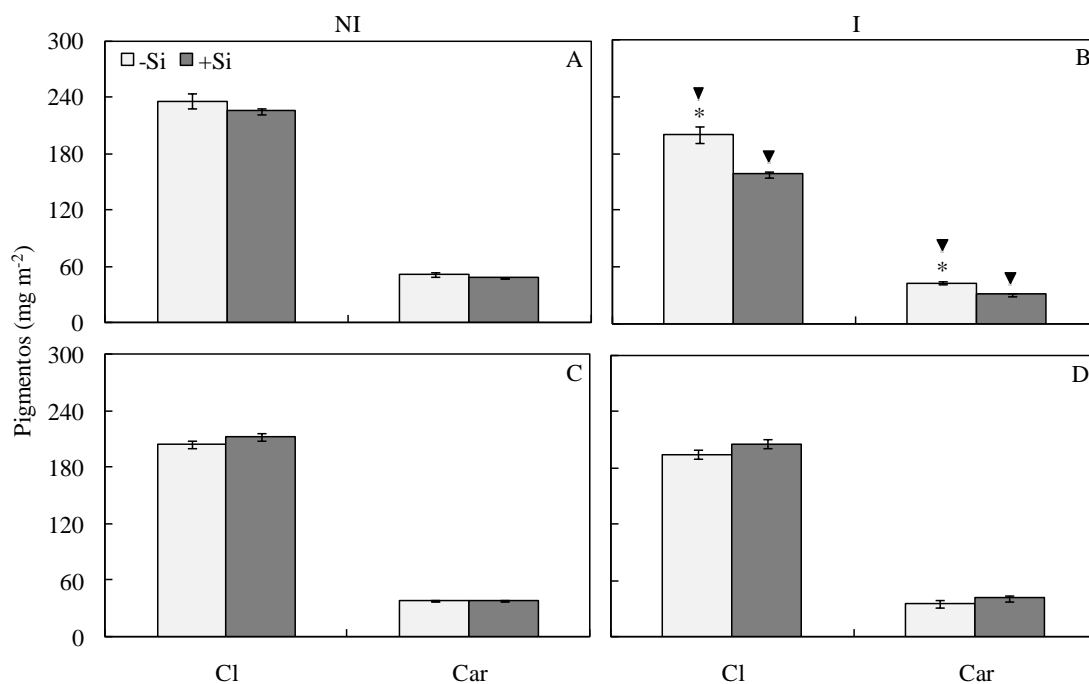
**Figura 4.** Taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) (A, B), condutância estomática (g<sub>s</sub>) (C, D), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) (E, F) e taxa de transpiração (E) (G, H) em folíolos de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G) ou inoculadas (I) (B, D, F, H) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste *t* ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste *t* ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



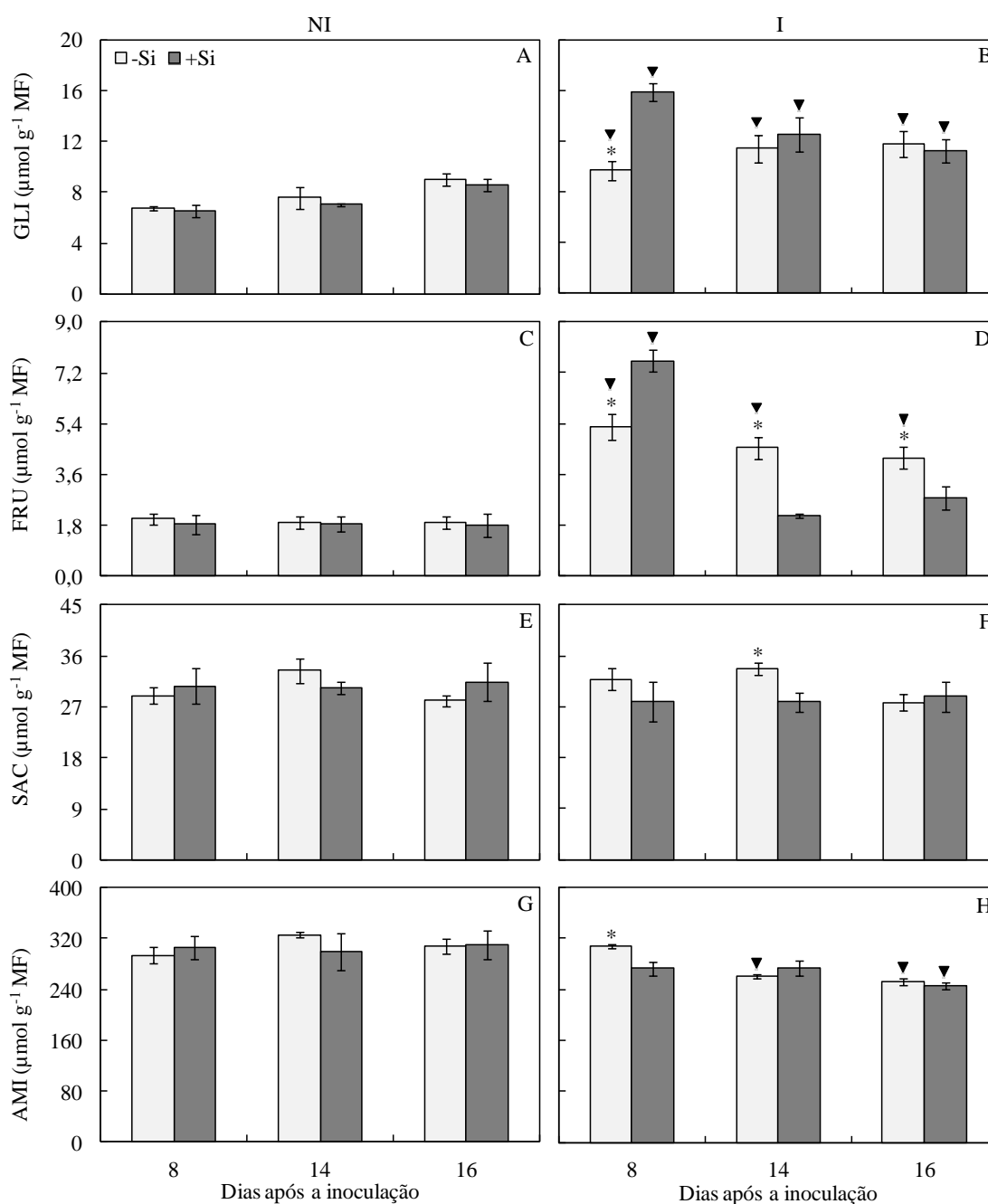
**Fig. 5.** Eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (A, B), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) (C, D), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (E, F), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (G, H) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (I, J) em folíolos de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo ( $\blacktriangledown$ ), dentro de cada época de coleta e concentração de silício, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão em relação à média.



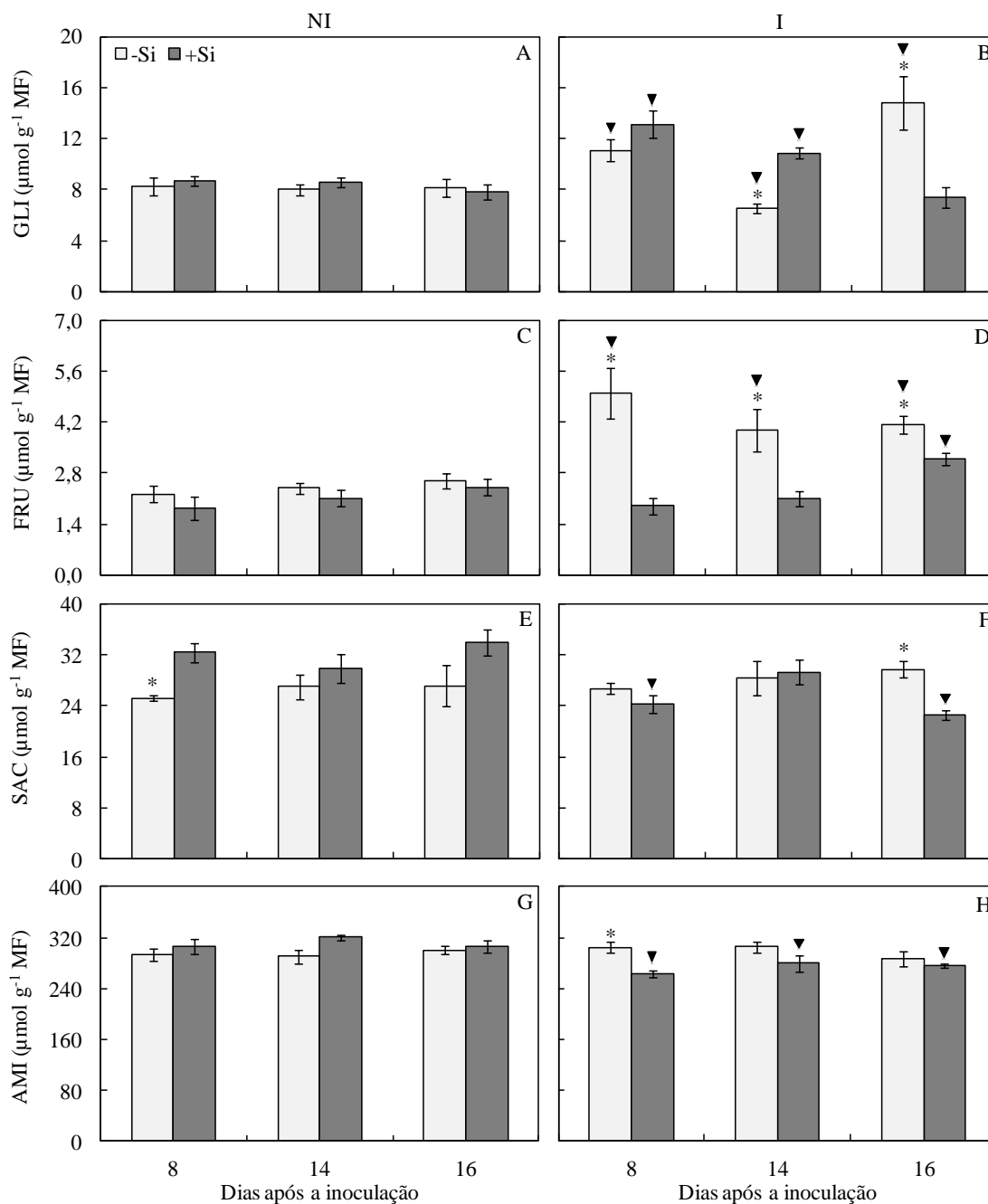
**Fig. 6.** Eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (A, B), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) (C, D), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (E, F), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (G, H) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (I, J) em folíolos de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo ( $\blacktriangledown$ ), dentro de cada época de coleta e concentração de silício, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão em relação à média.



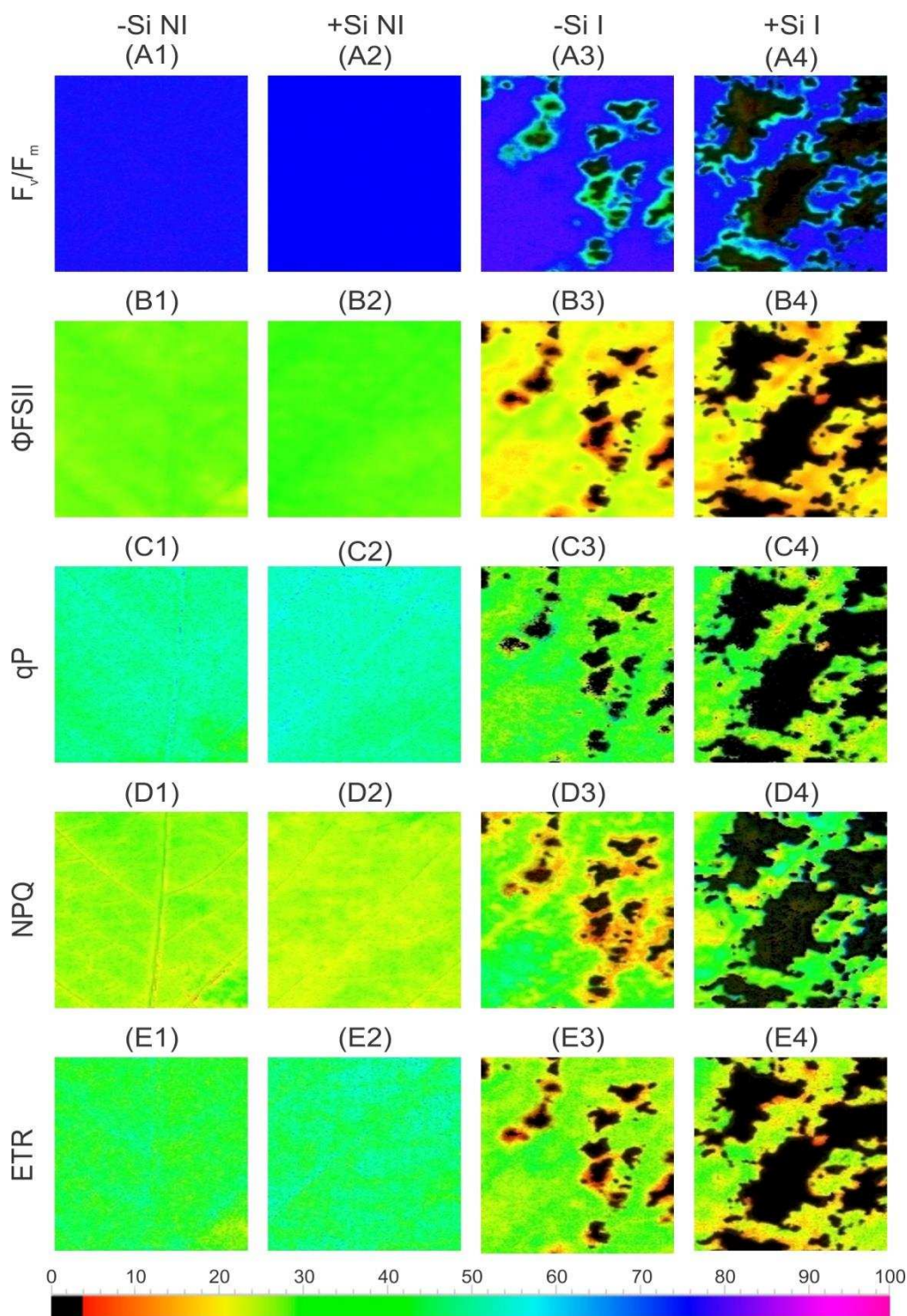
**Fig. 7.** Concentrações de clorofilas (Cl) e carotenoides (Car) em folíolos de plantas de soja das cvs. Bossier (A, B) e Conquista (C, D) crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C) ou inoculadas (I) (B, D) com *Cercospora soja*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*) são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e concentração de silício, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão em relação à média.



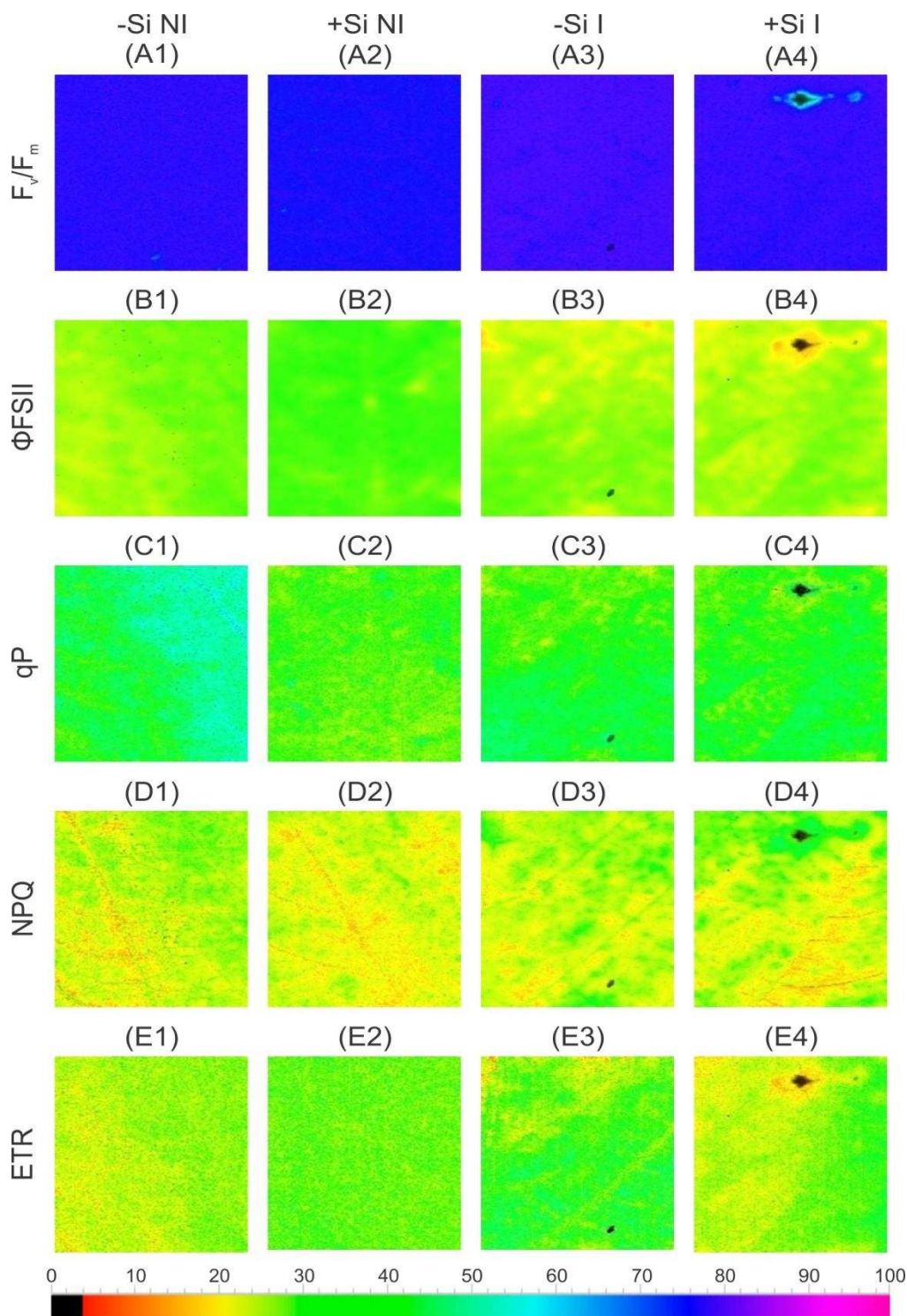
**Figura 8.** Concentrações de glicose (GLI) (A, B), frutose (FRU) (C, D), sacarose (SAC) (E, F) e amido (AMI) (G, H) em folíolos de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G) ou inoculadas (I) (B, D, F, H) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 9.** Concentrações de glicose (GLI) (A, B), frutose (FRU) (C, D), sacarose (SAC) (E, F) e amido (AMI) (G, H) em folíolos de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G) ou inoculadas (I) (B, D, F, H) com *Cercospora soja*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 10.** Imagens de fluorescência da clorofila *a* para as variáveis eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (A1-A4), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) (B1-B4), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (C1-C4), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (D1-D4) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (E1-E4) em folíolos de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 mM de silício (-Si) (A1, A3, B1, B3, C1, C3, D1, D3, E1 e E3) ou 2 mM de silício (+Si) (A2, A4, B2, B4, C2, C4, D2, D4, E2 e E4) e não inoculadas (NI) (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1 e E2) ou inoculadas (I) (A3, A4, B3, B4, C3, C4, D3, D4, E3 e E4) com *Cercospora soja* aos 16 dias após inoculação.



**Figura 11.** Imagens de fluorescência da clorofila *a* para as variáveis eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (A1-A4), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) (B1-B4), coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) (C1-C4), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (D1-D4) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (E1-E4) em folíolos de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 mM de silício (-Si) (A1, A3, B1, B3, C1, C3, D1, D3, E1 e E3) ou 2 mM de silício (+Si) (A2, A4, B2, B4, C2, C4, D2, D4, E2 e E4) e não inoculadas (NI) (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1 e E2) ou inoculadas (I) (A3, A4, B3, B4, C3, C4, D3, D4, E3 e E4) com *Cercospora soja* aos 16 dias após inoculação.

### *Capítulo 3*

**Mecanismo de defesa e atividade de hidrolases da parede celular em plantas de soja supridas com silício e infectadas por *Cercospora sojina***

## RESUMO

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das doenças foliares mais importantes da cultura da soja, pois pode acarretar grandes perdas na produtividade. Atualmente, a incidência dessa doença tem aumentado em várias regiões do mundo, inclusive no sul do Brasil, o que indica que novas epidemias possam ocorrer. Considerando que o silício (Si) potencializa a resistência de inúmeras espécies de plantas a patógenos, neste estudo foi avaliado o efeito do Si sobre a atividade de enzimas de defesa e na concentração de fenóis e lignina em plantas de soja infectadas por *C. sojina* aos 8, 14 e 16 dias após a inoculação (dai). Além disso, a importância de algumas enzimas de degradação da parede celular (EDPC) vegetal para o processo infeccioso de *C. sojina*, bem como o efeito do Si sobre a atividade dessas enzimas foi avaliado nas mesmas épocas descritas anteriormente. Plantas de soja das cvs. Bossier e Conquista, suscetível e resistente à mancha olho de rã, respectivamente, foram crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de Si (-Si e + Si, respectivamente) e inoculadas ou não com *C. sojina*. A severidade da doença mancha olho de rã aos 16 dai foi maior nas plantas da cv. Bossier, independentemente do Si. Para as duas cultivares, maiores valores de severidade foram encontrados nas plantas supridas com Si em relação às não supridas. O suprimento com Si não alterou a atividade de enzimas de defesa e de EDPC nem as concentrações de fenóis solúveis totais e de lignina das plantas não inoculadas, independentemente da cultivar. Entretanto, o Si, de modo geral, resultou em menores atividades das enzimas lipoxigenase, felilalanina-amônia-liase, quitinase, peroxidase inespecífica e polifenoloxidase, além de aumento na atividade de enzimas líticas de componentes da parede celular em plantas de soja infectadas por *C. sojina*. Esses resultados evidenciam que o suprimento de plantas de soja com Si resultou em menores atividades de enzimas de defesa contra patógenos e também favoreceu o processo infeccioso de *C. sojina* mediante aumento da atividade de enzimas líticas da parede celular, levando à menor resistência contra *C. sojina* nas duas cultivares, porém de forma mais pronunciada para cv. Bossier.

*Palavras chave:* *Glycine max*, enzimas, fenóis, lignina e mancha olho de rã.

## INTRODUÇÃO

A mancha olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina* K. Hara, é uma das doenças foliares mais importantes da cultura da soja, porém ocorre também em sementes, legumes e hastes (Lucena *et al.*, 1982). Os sintomas nas folhas iniciam-se como pequenas manchas de aspecto encharcado (anasarca), evoluindo para coloração castanho-clara no centro com bordos castanho-avermelhados na superfície adaxial e cinza na superfície abaxial (Almeida *et al.*, 2005). Nas hastes e legumes, as lesões apresentam aspecto de anasarca na fase inicial, evoluindo para manchas castanho-escuras de formato circular. Nas sementes, a infecção por *C. sojina* acarreta rachaduras e manchas de coloração parda a cinza (Almeida *et al.*, 2005).

Atualmente, a mancha olho de rã tem aumentado em várias regiões de clima quente e úmido, inclusive no sul do Brasil (Reis *et al.*, 2012). O controle da mancha olho de rã baseia-se principalmente na resistência e na aplicação de fungicidas. Contudo, a resistência de plantas de soja contra a mancha olho de rã está atualmente condicionada por apenas um gene, *Rcs3* (Missaoui *et al.*, 2007), impondo uma forte pressão de seleção na população do patógeno com o risco da ocorrência de novas epidemias, uma vez que *C. sojina* apresenta grande variabilidade genética (Almeida *et al.*, 2005). Portanto, o controle efetivo da doença exigiria, além da utilização de variedades resistentes e aplicação de fungicidas, a utilização de métodos alternativos de manejo da doença, como por exemplo, o uso da nutrição mineral.

Entre os vários elementos minerais, é amplamente reconhecido que o silício (Si) potencializa a resistência de várias espécies de plantas economicamente importantes contra a infecção por vários patógenos (Datnoff *et al.*, 2007). Os mecanismos de resistência a doenças conferida pelo Si permanecem ainda em discussão pela comunidade científica. Além da hipótese da barreira física e mecânica, existem várias evidências do envolvimento desse elemento na cascata de sinalização, a qual culminaria na ativação de genes relacionados com a defesa da planta. Rodrigues *et al.* (2003), por exemplo, reportaram que o Si reduziu a hidrólise da celulose em plantas de arroz infectadas por *Pyricularia grisea* devido ao acúmulo de compostos fenólicos. Além disso, plantas de arroz supridas com Si apresentaram aumento na resistência contra *P. grisea* mediante o aumento nos transcritos dos genes que codificam para as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), peroxidase (POX) e para proteína PR-1, além da maior concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) (Rodrigues *et al.*, 2005). Fortunato *et al.* (2012) reportaram que a severidade do mal do Panamá foi reduzida em plantas de bananeira supridas com Si mediante a maior atividade das

enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidasas (PFO), quitinases (QUI), GLU e POX, e concentração de fenóis solúveis totais (CSFT) e DLATG.

Embora estudos sobre a utilização do Si na defesa da soja a doenças seja ainda escassos na literatura, Lemes *et al.* (2011) obtiveram controle da ferrugem da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachrhizi*, quando as plantas foram supridas com Si. Portanto, a hipótese deste estudo foi de que o Si propiciaria a defesa de plantas de soja contra a infecção por *C. sojina*, via aumento na atividade de enzimas de defesa. Além disso, hipotetizou-se que o Si potencializaria o aumento na concentração de CSFT e DLATG e, conseqüentemente, maior resistência da parede celular e redução da ação deletéria de enzimas de degradação da parede celular. Portanto, o objetivo do trabalho foi determinar o efeito do Si sobre a atividade das enzimas de defesa FAL, PFO, QUI, GLU, POX e lipoxigenase (LOX), além da concentração de CSFT e DLATG em plantas de soja resistentes e suscetíveis a *C. sojina*. Em adição, foi investigada a importância das enzimas de degradação da parede celular vegetal, como a celulase (CEL), xilanase (XIL), pectinometilsterase (PME) e poligalacturonase (PG) para o processo infeccioso de *C. sojina* em plantas de soja supridas com Si.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparo da solução nutritiva.** A solução nutritiva foi preparada com base na solução proposta por Clark (1975), com algumas modificações, sendo constituída por: 1,04 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,8 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,069 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,931 mM  $\text{KCl}$  e 0,6 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 19  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 7  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 90  $\mu\text{M}$  EDTA. O Si foi suprido como ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, forma  $\text{H}^+$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma *et al.*, 2002). O Si foi adicionado à solução nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mM (+Si). A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial.

**Crescimento das plantas.** Sementes de soja das cultivares Bossier e Conquista, suscetível e resistente a *C. soja*, respectivamente (Gravina *et al.*, 2004; Juliatti *et al.*, 2006), foram esterilizadas por 3 min em solução de hipoclorito de sódio 10%, lavadas em água desionizada e germinadas em rolos de papel “germiteste” em uma câmara de germinação a 25°C. Após germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em vasos plásticos contendo solução nutritiva com 1/4 da força iônica da solução anteriormente citada, mas sem adição de Si. Após esse período, três plântulas foram transferidas para novos vasos plásticos com 5 L de solução nutritiva com a força iônica total, contendo ou não Si, sob contínua aeração. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias, e o pH da solução nutritiva foi verificado diariamente, o qual foi mantido entre 5,5 e 5,8. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ , a  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

**Preparo do inóculo.** O isolado de *C. soja* (UFV-22) utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Prof. Tuneo Sedyama (Departamento de Fitotecnia da UFV). O isolado foi preservado em tiras de papel-filtro em sílica gel a 4°C. Dez dias antes da inoculação, pedaços dessas tiras foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após o crescimento micelial, discos de meio contendo o fungo foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio V8. As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de água desionizada contendo gelatina 1% (m/v) em cada placa de Petri e os conídios foram cuidadosamente removidos com pincel de cerdas macias. A suspensão de conídios foi calibrada em hemacitômetro para a concentração de  $4 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

**Procedimento de inoculação das plantas.** Após 20 dias da adição de Si na solução nutritiva, na superfície adaxial e abaxial de todas as folhas de cada planta (estádio V6) (Fehr *et al.*, 1971) foram pulverizados 20 mL da suspensão de conídios do isolado de *C. soja* UFV-22 na concentração de  $4 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, utilizando-se um atomizador (VLS-Set Airbrush, Companhia Paache Airbrush, USA). Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmaras de crescimento de plantas (CCP), instaladas dentro da casa de vegetação, permanecendo até o final dos experimentos. As CCP, construídas de madeira, possuem 2 m de largura, 1,5 m de altura, 5 m de comprimento e cobertura com plásticos de 100 µm de espessura. Dentro da CCP, a densidade máxima de fluxo de fótons na altura do dossel foi de aproximadamente 700 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e a temperatura foi de 25 ± 2°C e 20 ± 2°C durante o dia e noite, respectivamente. A umidade relativa foi mantida a 92 ± 3% mediante a um sistema de nebulização (NEB-100; KGF Companhia, São Paulo, Brasil), o qual foi programado para pulverizar névoa a cada 30 min acima da copa das plantas. A umidade relativa e a temperatura foram mensuradas com um termo-higrógrafo (TH-508, Impac, Brasil). As plantas inoculadas ou não inoculadas foram mantidas em câmaras separadas, porém sob as mesmas condições até o final do experimento.

**Avaliação da severidade da mancha olho de rã e determinação da concentração foliar de Si.** Para a avaliação da severidade da doença aos 16 dai, selecionou-se a sexta folha, do ápice para a base, por essa apresentar maior severidade da doença. Para isto, as folhas foram digitalizadas em resolução de 600 dpi, e as imagens foram processadas utilizando-se o software Quant (Liberato, 2003). A porcentagem da área foliar com sintomas da mancha olho de rã foi considerada a estimativa da severidade pelo Quant (Seq). Após esse processo, essas folhas foram secas para a determinação da concentração foliar de Si, a qual foi realizada conforme descrito por Korndörfer *et al.* (2004).

**Avaliações bioquímicas:** Para todas as análises bioquímicas, selecionou-se o quarto, quinto e sexto trifólios das plantas, a partir da base, coletados aos 8, 14 e 16 dai.

**Determinação da atividade de enzimas lipoxigenase (LOX, EC 1.13.11.12), felilalanina-amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5), β-1,3-glucanase (GLU, EC 3.2.1.6), quitinase (QUI, EC 3.2.1.14), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1).** A obtenção do extrato foliar foi realizada a partir da maceração de 0,3 g de tecido foliar em N<sub>2</sub> líquido até obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionou-se o meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). Em seguida, procedeu-se a

centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para determinação da atividade das enzimas LOX, FAL, GLU, QUI e PFO. A obtenção do sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da POX ligada ionicamente à parede celular foi realizada a partir da maceração de 0,3 g de tecido foliar em N<sub>2</sub> líquido até obtenção de um pó fino. Em seguida, adicionou-se o meio de extração idêntico ao descrito anteriormente, e posteriormente procedeu-se à centrifugação a 1.000 g por 10 min a 4°C (Ranieri *et al.*, 2001). O sobrenadante obtido foi centrifugado novamente a 1.000 g por 10 min. Subsequentemente, o pellet foi lavado duas vezes com tampão de extração, duas vezes com água (4°C) e, posteriormente, incubado em Triton X-100 2% a 4°C, sob agitação contínua por 1 h. O pellet foi lavado novamente duas vezes com água (4°C) e incubado em NaCl 1 M por 2 h a 4°C. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1.000 g por 10 min a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da POX oriunda da fração iônica da parede celular.

A atividade da LOX foi determinada após a adição de 10 µL do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e linoleato de sódio 50 µM. O meio de reação foi incubado a 25°C e a absorbância do produto liberado pela LOX foi determinada a 234 nm durante o primeiro minuto de reação. O coeficiente de extinção molar de 25.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da LOX (Axelrod *et al.*, 1981).

A atividade da FAL foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Guo *et al.* (2007), com algumas modificações. A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão borato de sódio 40 mM (pH 8,8) e L-fenilalanina 20 mM em um volume de 1 mL. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30°C durante 1 h. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 50 µL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi determinada a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de 100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da FAL (Zucker, 1965). Nas amostras controle, o procedimento foi realizado conforme descrito anteriormente, porém a parada de reação foi realizada imediatamente após a adição do extrato foliar ao meio de reação.

A atividade da GLU foi determinada pela adição de 20 µL do extrato foliar ao meio de reação composto de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e laminarina 1 mg mL<sup>-1</sup> (Lever, 1972). A mistura da reação foi incubada em banho-maria por 1 h a 45°C. Após esse período, adicionou-se à mistura de reação 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura de reação foi incubada novamente em banho-maria por 15 min a 100°C e, posteriormente, foi resfriada em gelo até a temperatura de 25°C. A absorbância foi medida a 540 nm e a quantidade de açúcares redutores liberada foi

calculada a partir de uma curva de calibração usando glicose como padrão (Miller, 1959). Para as amostras controle, o procedimento foi realizado conforme descrito anteriormente, porém sem a primeira incubação.

A atividade da QUI foi determinada segundo a metodologia proposta por Harman *et al.* (1993). A reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante ao meio de reação constituído de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-N-N'-diacetilquitobiose (PNP) 0,1 mM. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 h. A reação foi interrompida com adição de 500  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 0,2 M. Nas amostras controle, o carbonato de sódio foi adicionado imediatamente após a adição do extrato foliar à mistura de reação. A absorbância do produto final liberado pela QUI foi determinada a 410 nm. Para calcular a atividade da QUI utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 70  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

A atividade da POX foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 20 mM em um volume de 2 mL (Kar e Mishra, 1976). A reação foi iniciada pela adição de 15  $\mu\text{L}$  do extrato foliar e a absorbância foi determinada a 420 nm, durante 1 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da POX (Chance e Maehley, 1955). A atividade da PFO foi determinada da mesma forma que a da POX, com exceção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  que foi omitido da mistura de reação.

**Determinação da atividade de enzimas celulase (CEL, 3.2.1.4), xilanase (XIL, EC 3.2.1.8), pectina metil esterase (PME, EC 3.1.1.11) e poligalacturonase (PG, EC 3.2.1.15).** A obtenção do extrato foliar foi realizada conforme descrito para LOX, FAL, GLU, QUI e PFO.

A atividade da CEL foi determinada conforme descrito por Ahmed e Labavitch (1980). A reação foi iniciada pela adição de 75  $\mu\text{L}$  do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e carboximetilcelulose (CMC) 1,5% (m/v) em um volume de 1 mL. Essa mistura de reação foi incubada em banho-maria por 16 h a 37°C e, após esse período, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de DNS. A mistura de reação foi incubada novamente em banho-maria por 7 min a 100°C e, em seguida foi resfriada em banho de gelo até a temperatura de 25°C. A absorbância do produto liberado pela CEL foi determinada a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores liberada foi calculada a partir de uma curva de calibração usando glicose como padrão (Miller, 1959). Para as amostras controle, o procedimento foi realizado conforme descrito acima, porém sem a primeira incubação.

A atividade da XIL foi determinada pela adição de 150  $\mu$ L do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e xilano 0,1% em um volume de 1 mL (Singh e Singh, 1993). A mistura de reação foi incubada em banho-maria por 1 h a 37°C e, após esse período, determinou-se a concentração de açúcares redutores conforme descrito para CEL.

A atividade da PME foi determinada conforme descrito por Hagerman e Austin (1986) com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ L do extrato foliar ao meio de reação constituído de pectina 0,01% (pH 7,5), NaCl 0,15 M e 100  $\mu$ L da solução de azul de bromotimol 0,01% em um volume de 2 mL. A absorbância foi determinada a 620 nm imediatamente após a adição do sobrenadante à mistura de reação e, após 3 min procedeu-se novamente à leitura da absorbância. A diferença entre as absorbâncias a 0 e 3 min foi determinada e a atividade da PME foi calculada através de uma curva de calibração utilizando pectina como padrão.

A atividade da PG foi determinada pela adição de 75  $\mu$ L do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão acetato de sódio 40 mM (pH 4,5) e ácido poligalacturônico 0,3% (pH 4,5) em um volume de 1 mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria por 1 h a 37°C e, posteriormente foram adicionados 250  $\mu$ L da solução de DNS. A mistura de reação foi incubada novamente em banho-maria por 10 min a 100°C e, em seguida, foi resfriada em banho de gelo a temperatura de 25°C. A absorbância do produto liberado pela PG foi determinada a 540 nm. Para as amostras controle, o procedimento foi realizado conforme descrito previamente, porém sem a primeira incubação. Sob as condições descritas anteriormente, uma unidade de PG catalisa a liberação de 1 nmol de ácido galacturônico em 1 s (Pathak e Sanwal, 1998).

As atividades das enzimas foram expressas em base de proteína, cuja concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

**Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG).** Para a obtenção do extrato metanólico, amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual foi adicionado 1 mL de metanol 80%. A solução permaneceu por 2 h em mesa agitadora a 300 rpm em temperatura ambiente e, posteriormente, foi centrifugada a 17.000 g por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de CFST e o pellet foi mantido a -20°C para determinação da concentração de DLATG.

A concentração de CFST foi determinada através do método desenvolvido por Zieslin e Ben-Zaken (1993) com algumas modificações. A reação foi iniciada com a adição de Fenol Folin-Ciocalteu 0,2 M a 150  $\mu$ L do extrato metanólico e mantido à

25°C por 5 min. Em seguida, adicionou-se à solução carbonato de sódio 0,1 M, a qual permaneceu incubada por 10 min a 25°C. Logo após, 1 mL de água desionizada foi adicionada à mistura, e procedeu-se novamente a incubação a 25°C por 1 h. A absorbância foi lida a 725 nm e a concentração de CFST foi realizada com base em uma curva de calibração usando catecol como padrão.

Para a mensuração da concentração de DLATG, o pellet foi ressuspendido com 1,5 mL de água desionizada e, após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 12 h a 65°C. O resíduo alcoólico-insolúvel seco foi usado para determinar a concentração de DLATG conforme descrito por Barber e Ride (1988). A absorbância dos DLATG no sobrenadante foi medida a 280 nm e a concentração foi determinada através de uma curva de calibração, na qual utilizou-se lignina alcalina éter 2-hidroxipropil como padrão.

**Delineamento experimental e análise estatística dos dados.** Para a avaliação de todas as variáveis deste estudo, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para a concentração de Si foliar, foi utilizado o esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2$ , consistindo de plantas supridas (+Si) ou não (-Si) com Si, duas cultivares de soja (Bossier e Conquista) e plantas inoculadas ou não com *C. soja*na. Para a severidade da mancha olho de rã, foi utilizado o esquema fatorial  $2 \times 2$  (plantas -Si ou +Si) e as duas cultivares de soja. Para a atividade das enzimas LOX, FAL, GLU, QUI, POX, PFO, CEL, XIL, PME e PG, bem como a concentração de CFST e de DLATG, utilizou-se o esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2 \times 3$  [plantas -Si ou +Si, as duas cultivares de soja, plantas inoculadas ou não e três épocas de avaliação (8, 14 e 16 dai)]. Cada unidade experimental foi constituída de um vaso plástico de 5 L com três plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t* ( $P \leq 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS

**Concentração foliar de Si.** Apenas o fator concentrações de Si foi significativo para a concentração foliar de Si (Tabela 1). A concentração foliar de Si foi maior nas plantas supridas com Si comparadas às não supridas (Figura 1).

**Severidade da mancha olho de rã.** Os fatores cultivares, concentrações de Si, bem como sua interação, foram significativos para a severidade da mancha olho de rã (Tabela 1). A severidade foi maior para a cv. Bossier do que para a cv. Conquista, independentemente do Si (Figura 2). Para as duas cultivares, a severidade foi maior nas plantas supridas com Si comparadas às não supridas (Figura 2).

**Variáveis bioquímicas.** As atividades da LOX, FAL, GLU, QUI, POX, PFO, CEL, XIL, PME e PG e as concentrações de CFST e DLATG foram significativamente influenciadas por pelo menos um dos fatores estudados, bem como algumas interações duplas e triplas entre eles (Tabela 1). A interação cultivares  $\times$  inoculação  $\times$  épocas de avaliação  $\times$  concentrações de Si foi significativa para as atividades da LOX, GLU, QUI, PFO, CEL e PG (Tabela 1).

Nas plantas não inoculadas das duas cultivares, as atividades das enzimas LOX, FAL, GLU, QUI, POX, PFO, CEL, XIL, PME e PG, bem como as concentrações de CFST e de DLATG não apresentaram diferença entre plantas não supridas com Si em relação às supridas (Figura 3A, C, E, G, I e K; Figura 4A, C, E, G, I e K; Figura 5A e C; Figura 6A e C; Figura 7A, C, E e G; Figura 8A, C, E e G). Para as plantas inoculadas da cv. Bossier, houve maior atividade da LOX e POX nas plantas do tratamento -Si em relação às do tratamento +Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3B e J). A atividade da QUI das plantas do tratamento -Si foi menor aos 14 dai e maior aos 16 dai comparada às plantas do tratamento +Si (Figura 3H). Houve maior atividade da PFO aos 8 dai e da FAL aos 16 dai nas plantas do tratamento -Si do que nas do tratamento +Si (Figura 3D e L). A atividade da GLU não foi influenciada pelo suprimento de Si (Figura 3F). Houve maior concentração de CFST aos 8 dai nas plantas do tratamento -Si em relação às do tratamento +Si (Figura 5B). A concentração de DLATG foi maior nas plantas do tratamento -Si do que nas do tratamento +Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 4D). Plantas do tratamento -Si apresentaram menor atividade da CEL e XIL aos 16 dai do que as plantas do tratamento +Si (Figura 7B e D). O suprimento com Si não influenciou as atividades da PME e da PG (Figura 7F e H). Nas plantas inoculadas da cv. Conquista, houve maiores atividades da FAL e POX nas plantas do tratamento -Si em relação às do tratamento +Si aos 8, 14 e 16 dai (Figura 4D e J). Plantas do tratamento -Si apresentaram maior atividade da LOX aos 8 e 14 dai e menor aos 16 dai comparadas às plantas do tratamento +Si (Figura 4B). A atividade da GLU nas plantas do tratamento -Si foi maior

do que nas do tratamento +Si aos 14 e 16 dai (Figura 4F). Para QUI e PFO, maiores atividades foram observadas para o tratamento -Si em relação ao tratamento +Si aos 8 dai (Figura 4H e L). Houve menor concentração de CFST nas plantas do tratamento -Si do que nas do tratamento +Si aos 14 e 16 dai (Figura 6B). Plantas do tratamento -Si apresentaram maior concentração de DLATG aos 8 dai do que as plantas do tratamento +Si (Figura 6D). As atividades da CEL, XIL e PG aos 14 e 16 dai e da PME aos 8, 14 e 16 dai foram menores nas plantas do tratamento -Si em relação às do tratamento +Si (Figura 8 B, D, F e H).

Para as plantas da cv. Bossier do tratamento -Si, a atividade da LOX foi maior aos 8 dai e menor aos 14 e 16 dai nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas (Figura 3A e B). As atividades da FAL, GLU, QUI e POX foram maiores nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3C, D, E, F, G, H, I e J). Houve maior atividade da PFO aos 8 dai e menor aos 14 dai nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas (Figura 3K e L). Plantas inoculadas apresentaram maior concentração de CFST aos 8 dai e de DLATG aos 8 e 14 dai em relação às plantas não inoculadas (Figura 5A, B, C e D). As atividades da CEL e da XIL foram maiores nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 16 dai (Figura 7A, B, C e D). A inoculação com *C. soja* não influenciou as atividades da PME e da PG aos 8, 14 e 16 dai (Figura 7E, F G e H). Para as plantas da cv. Conquista do tratamento -Si, houve maiores atividades da FAL, QUI e POX nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 4C, D, G, H, I e J). A atividade da LOX foi maior aos 8 e 14 dai e menor aos 16 dai nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas (Figura 4A e B). A atividade da PFO foi maior nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 8 e 14 dai (Figura 4K e L). Houve maior atividade da GLU nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 8 dai (Figura 4E e F). A concentração de DLATG foi maior nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 6C e D). No entanto, não houve diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas para a concentração de CFST (Figura 6A e B). Nas plantas inoculadas houve maior atividade da CEL comparadas às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 8A e B). Houve maior atividade da XIL nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 8 e 14 dai, e não houve diferença para PME e PG (Figura 8A, B, C, D, E, F, G e H).

Nas plantas da cv. Bossier do tratamento +Si, houve maiores atividades da FAL, GLU, QUI e POX e menor atividade da LOX nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 3A, B, C, D, E, F, G, H, I e J). A atividade da PFO foi maior aos 8 dai e menor aos 14 e 16 dai nas plantas inoculadas comparadas às não

inoculadas (Figura 3K e L). Não foi observada diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas para a concentração de CFST (Figura 5A e B). A concentração de DLATG foi maior para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 8 e 14 dai (Figura 5C e D). Houve maiores atividades da CEL e da XIL para as plantas inoculadas em relação às não inoculadas aos 16 dai, mas não houve diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas para as atividades da PME e da PG (Figura 7A, B, C, D, E, F, G e H). Para as plantas da cv. Conquista do tratamento +Si, observou-se maiores atividades da QUI e da POX para as plantas inoculadas do que para as não inoculadas aos 8, 14 e 16 dai (Figura 4G, H, I e J). Houve maior atividade da LOX aos 8 e 14 dai e da FAL aos 14 e 16 dai nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas (Figura 4A, B, C e D). Houve maiores atividades da GLU e da PFO em plantas inoculadas do que nas não inoculadas aos 8 e 14 dai, respectivamente (Figura 4E, F, K e L). As concentrações de CFST e de DLATG aos 14 e 16 dai e aos 8, 14 e 16 dai, respectivamente, foram maiores nas plantas inoculadas comparadas às não inoculadas (Figura 6A, B, C e D). Plantas inoculadas apresentaram maiores atividades da CEL e da PME aos 8, 14 e 16 dai e da XIL e da PG aos 14 e 16 dai comparadas às plantas não inoculadas (Figura 8A, B, C, D, E, F, G e H).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, as atividades de enzimas envolvidas na defesa de plantas a patógenos e as concentrações de CFST e DLATG não foram alteradas pelo suprimento com Si em plantas de soja não inoculadas com *C. sojina*. Além disso, o Si não alterou as atividades de enzimas de degradação da parede celular vegetal para as duas cultivares de soja estudadas. Corroborando com estes resultados, Chain *et al.* (2009) reportaram que plantas de trigo supridas com Si apresentaram alterações mínimas na expressão gênica na ausência de estresse. Adicionalmente, Fauteux *et al.* (2006) observaram que o Si não modificou o nível de transcritos de proteínas relacionadas com a patogênese em plantas de *Arabidopsis thaliana* na ausência de estresse, nem daqueles relacionados à rota dos fenilpropanóides e os que codificam para a QUI. Tomados em conjunto, esses resultados nos permite inferir que o efeito do Si sobre o metabolismo de defesa contra patógenos é pouco expressivo em plantas na ausência de estresse. Todavia, existem vários relatos na literatura de que o Si potencializa a defesa de plantas contra a infecção por vários patógenos mediante a potencialização de mecanismos bioquímicos (Rodrigues *et al.*, 2004; Xavier Filha *et al.*, 2011; Dallagnol *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012, Fortunato *et al.*, 2012). Neste estudo, entretanto, o Si aumentou a suscetibilidade de plantas de soja à infecção por *C. sojina* em ambas as cultivares de soja, porém de forma mais proeminente para a cultivar suscetível. Isso possivelmente ocorreu pela menor concentração de DLATG, associada à menor atividade das enzimas LOX, FAL, GLU, QUI, POX e PFO. Os trabalhos realizados por Maher *et al.* (1994) e Gnanamangai *et al.* (2011) dão suporte para este resultado, pois esses autores observaram que o aumento na atividade de enzimas da rota dos fenilpropanóides como a FAL e POX, responsáveis pela síntese de DLATG, contribuem para defesa de *Nicotiana tabacum* e *Camellia sinensis* contra *Cercospora* spp.

A produção e a liberação de enzimas líticas no apoplasto é um mecanismo importante para o processo infeccioso de vários patógenos (Cantu *et al.*, 2008). Neste estudo, independentemente do Si, a infecção das plantas de soja por *C. sojina* desencadeou incrementos nas atividades das enzimas CEL e da XIL, evidenciando a importância dessas para a agressividade de *C. sojina*. Além da CEL e XIL, a infecção das plantas da cultivar resistente por *C. sojina* potencializou aumento nas atividades das enzimas pectinolíticas PME e PG, porém apenas para plantas supridas com Si. Portanto, esses resultados sugerem que o Si favoreceu o processo infeccioso de *C. sojina* via aumento na atividade de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, porém em menor proporção para a cultivar suscetível. A maior atividade de enzimas líticas de componentes da parede celular das plantas disponibiliza fontes de carbono e açúcares

simples necessários à colonização dos patógenos nos tecidos do hospedeiro (Gnanamangai *et al.*, 2011). Considerando-se que as plantas sintetizam proteínas inibidoras que neutralizam o efeito dessas enzimas líticas, como as inibidoras da PG e PME (Mahalingam *et al.*, 1999; Reignault *et al.*, 2008), esses resultados evidenciam que o suprimento das plantas com Si de alguma forma limitou a defesa das plantas contra a degradação da parede celular. Corroborando com o presente estudo, a síntese e a liberação de enzima pectinolíticas e celulases por *Cercospora theae* contribuíram para o aumento da agressividade do fungo a *Camellia sinensis* (Gnanamangai *et al.*, 2011).

Neste estudo, aumentos nas atividades das enzimas LOX e PFO para a cv. resistente e decréscimo na atividade dessas enzimas para cv. suscetível aos 14 dai, desencadeados pela infecção por *C. sojina*, evidenciam a importância dessas enzimas para a defesa da soja. Semelhantemente ao observado neste estudo, a importância das enzimas LOX e PFO na defesa de plantas contra patógenos foi relatada para vários outros patossistemas (Kolomiets *et al.*, 2000; Li e Steffens, 2002; Sahoo *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2012). O aumento na atividade da enzima PFO eleva os níveis de quinonas, as quais podem limitar o desenvolvimento de vários fungos, conforme observado para *Phlyctaena vagabunda*, *Sclerotinia fructigena* e *Venturia inaequalis* (Lattanzio *et al.*, 2001; Lattanzio *et al.*, 2006). Em adição, o aumento na resistência de plantas de soja contra *C. sojina*, mediante o incremento na atividade da LOX pode ser devido à ampliação de respostas de defesas, pois essa enzima está envolvida na produção de moléculas sinalizadoras, como o ácido jasmônico e peróxidos lipídicos (Hammond-Kosack e Jones, 1996). Porém, além dos seus inúmeros efeitos benéficos, a LOX pode causar danos às membranas celulares (Brash, 1999), o que pode favorecer a infecção dos tecidos foliares de plantas de soja por *C. sojina*, pois mudanças na permeabilidade de membranas são eventos cruciais para o sucesso da infecção por *Cercospora* spp. (Daub, 1982). Portanto, ressalta-se que a redução na atividade da LOX observada aos 16 dai para a cultivar resistente, possivelmente, seja determinante para a resistência das plantas de soja contra *C. sojina*.

A inoculação das plantas de soja com *C. sojina* acarretou incrementos nas atividades das enzimas POX e FAL para ambas as cultivares, independentemente do suprimento ou não de Si. Nas células vegetais, além do envolvimento da POX no aumento da concentração de lignina, a enzima também participa dos processos de suberização, incremento de ligações cruzadas de proteínas estruturais da parede celular, catabolismo das auxinas e regulação da senescência (Hiraga *et al.*, 2001), os quais também estão envolvidos nas repostas de defesa de plantas contra a infecção por patógenos. A FAL é uma enzima crucial para a síntese de lignina, compostos fenólicos

com potencial antimicrobiano e ácido salicílico (Schuster e Rétey, 1995, Borges *et al.*, 2012). Notadamente, o incremento nas atividades das enzimas POX e FAL usualmente resulta em aumento na concentração de DLATG, conforme observado neste estudo para as plantas de soja infectadas por *C. sojina*, independentemente da resistência da cultivar. Uma das formas pela qual DLATG conferem defesa de plantas contra patógenos é mediante a redução da difusão de toxinas (Siranidou *et al.*, 2002). E, considerando-se que a produção e a difusão de toxinas não seletivas nos tecidos do hospedeiro contribui para a agressividade de *Cercospora* spp. (Daub *et al.*, 2013), incluindo *C. sojina* (Kim *et al.*, 2011), sugere-se que a maior concentração de DLATG em plantas de soja tenha reduzido a difusão de toxinas produzida por *C. sojina*. Em adição, a redução na concentração de DLATG aos 16 dai desencadeada pela infecção por *C. sojina*, de forma mais proeminente para as plantas da cultivar suscetível supridas com Si, nos permite inferir que a manutenção de maiores níveis de DLATG seja crucial para a defesa da soja. Embora os CFST possam reduzir a infecção por patógenos via aumento da permeabilidade das membranas deles (Tomás-Barberán *et al.*, 1990), além de sua ação inibitória sobre enzimas fúngicas líticas da parede celular vegetal (Lattanzio *et al.*, 2006), neste estudo, o aumento de CFST não foi suficiente para conter os efeitos deletérios oriundos da infecção por *C. sojina*, independentemente da cultivar.

Neste estudo, independentemente do Si, a infecção das plantas por *C. sojina* resultou em aumento na atividade da GLU durante o processo infeccioso de *C. sojina* para a cultivar suscetível, porém apenas no início do processo infeccioso para a cultivar resistente. Em contrapartida, independentemente da cultivar, a atividade da QUI foi maior durante todo o processo infeccioso de *C. sojina*. Estes resultados sugerem que a QUI possui maior importância para a defesa de plantas de soja contra *C. sojina* do que a GLU. Corroborando com os resultados do presente estudo, Roulin e Buchala (1995) reportaram acúmulo de GLU durante a interação compatível entre *Arachis hypogaea*-*C. arachidiola*, porém não de QUI. Esses autores concluíram que a falta da enzima QUI pode ter sido determinante para a compatibilidade da interação, uma vez que o aumento na atividade da GLU por si só não foi capaz de inibir o crescimento do fungo. Da mesma forma, Taheri e Tarighi (2012) reportaram que a resistência de plantas de tomateiro à infecção por *Rhizoctonia solani* foi dependente do aumento da atividade da QUI.

Os resultados da presente investigação nos permite inferir que o suprimento de plantas de soja com Si, na ausência de estresse, não modifica os mecanismos bioquímicos clássicos de defesa contra patógenos. Todavia, o contrário ocorreu quando as plantas são submetidas à infecção por *C. sojina*. Nesse caso, nós mostramos que o

suprimento das plantas com Si resultou em um sistema bioquímico de defesa menos robusto comparado com o das plantas não supridas com esse elemento. Isso, possivelmente, foi determinante para acarretar a maior suscetibilidade de plantas de soja a *C. sojina*, independente da resistência da cultivar. Outro fator importante para o aumento da suscetibilidade de plantas de soja a *C. sojina* mediado pelo Si foi, possivelmente, a menor capacidade dessas plantas em limitar a degradação da parede celular. Porém, seria interessante a realização estudos adicionais para a completa elucidação do efeito negativo do suprimento de Si às plantas de soja contra a infecção por *C. sojina*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed AER, Labavith JM. (1980) Cell-wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate degrading enzymes in ripening bartlett pears. *Plant Physiology* 65: 1014-1016.
- Almeida AMR, Ferreira JT, Yorinori JFV, Henning AA, Godoy CV, Costamilan LM, Meyer MC. (2005) Doenças da soja (*Glycine max*). *In: Doenças das Plantas Cultivadas*, pg. 574, Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin A, Camargo LEA. (Eds). Editora Agronômica.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laasko S. (1981) Lipoxygenases from soybeans. *Methods. in Enzymology* 71: 441-451.
- Barber MS, Ride JP. (1988) A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 185-97.
- Borges A, Melotto M, Tsai SM, Caldas DGG. (2012) Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. *Journal of Plant Physiology* 169: 1216-1220.
- Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brash AR. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biology Chemistry* 20: 23679-23682.
- Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB, Powell ALT. (2008) Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science* 13: 610-616.
- Chain F, Côté-Beaulieu C, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR. (2009) A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1323-1330.
- Chance B, Maehley AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Clark RB. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural Food Chemistry* 23: 458-460.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC. (2011) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-Bipolaris oryzae interaction. *Phytopathology* 101: 92-104.

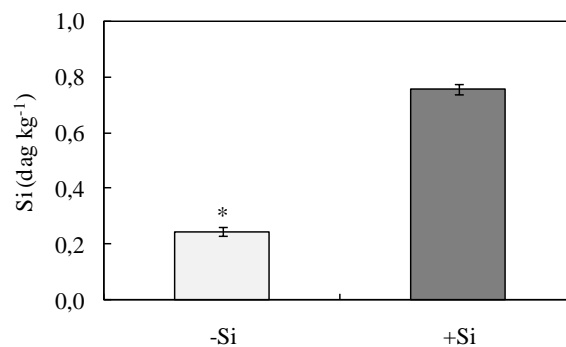
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold K. (2007) Silicon and Plant Disease. In: Mineral Nutrition and Plant Disease, (pp. 233-246). Eds LE Datnoff, WE Elmer and DM Huber. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Daub ME, Herrero S, Chung K-R. (2013) Reactive oxygen species in plant pathogenesis: the role of perylenequinone photosensitizers. *Antioxidants & Redox Signaling*, *in press*.
- Daub ME. (1982) Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 69: 1361-1364.
- Fauteux F, Chain F, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR. (2006) The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A* 103: 17554-17559.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929-931.
- Fortunato AA, Rodrigues FA, Nascimento KJT. (2012) Biochemistry and cell biology physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to fusarium wilt potentiated by silicon. *Phytopathology* 102: 957-966.
- Gnanamangai BM, Ponmurugan P, Yazhini R, Pragadeesh SK. (2011) PR enzymes activities of *Cercospora theae* causing bird's eye spot disease in tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O.kuntze). *Journal of Plant Pathology* 10: 13-21.
- Gravina GA, Sedyama CS, Martins SF, Moreira MA, Cruz CD. (2004) Multivariate analysis of combining ability for soybean resistance to *Cercospora sojina* Hara. *Genetics and Molecular Biology* 27: 395-399.
- Guo Y, Liu L, Bi Y. (2007) Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in China cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 42: 1012-1018.
- Hagerman AE, Austin P. (1986) Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 34: 440-444.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hao Z, Wang L, Liang J, Tao R. (2012) Expression of defense genes and activities of antioxidant enzymes in rice resistance to rice stripe virus and small brown planthopper. *Plant Physiology Biochemistry* 7:7 44-51.
- Harman GR, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Pietro AD, Peterbauer C, Tronsmo A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-18.

- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42: 462-468.
- Juliatti FC, Hamawaki OT, Cunha EPC, Polizel AC, Santos MA, Shigihara D. (2006) Severidade de doenças fúngicas foliares em genótipos de soja em três locais de plantio. *Bioscience Journal* 22: 83-89.
- Kar M, Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- Kim J-S, Lee Y-S, Kim S-K, Kim KD, Kim J-W. (2011) Differential responses of soybean cultivars to *Cercospora sojina* isolates, the causal agent of frog-eye leaf spot in Korea. *The Plant Pathology Journal* 27: 183-186.
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, Braun EJ, Hannapel DJ. (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiology* 124: 1121-1130.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 24 pp.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry* 37: 23-67.
- Lattanzio V, Venere DD, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno M. (2001) Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5817-5821.
- Lemes EM, Mackowiak CL, Blount A, Marois JJ, Wright DL, Coelho L, Datnoff LE. (2011) Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. *Plant Disease* 95: 317-324.
- Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47: 273-279.
- Li L, Steffens JC. (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.
- Liberato JR. (2003) Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- Lucena JAM, Castal MFC, Casela CR, Verneti FJ. (1982) Herança da resistência à raça 4 de *Cercospora sojina* Hara em soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 17: 1751-1755.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130: 2111-2117.

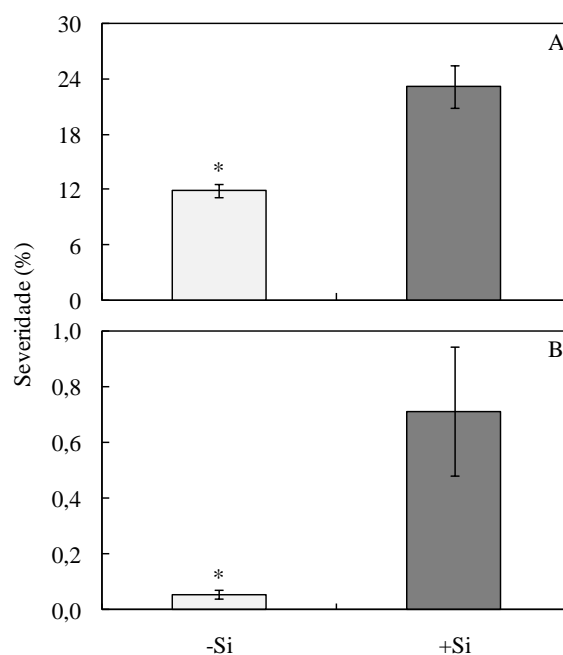
- Mahalingam R, Wang G, Knap HT. (1999) Polygalacturonase and polygalacturonase inhibitor protein: gene isolation and transcription in *Glycine max-Herodera glycines* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 490-498.
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ. (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 7802-7806.
- Miller GL. (1959) Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Missaoui A.M, HA BK, Phillips DV, Boerma HR. (2007) Single nucleotide polymorphism detection of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science* 47: 1681-1690.
- Pathak NS, Sanwal GG. (1998) Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. *Phytochemistry* 48: 249-255.
- Ranieri A, Castagna A, Baldan B, Soldatini GF. (2001) Iron deficiency differently affects peroxidases isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 52: 25-35.
- Reignault O, Valette-Collet O, Boccara M. (2008) The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology* 120: 1-11.
- Reis EM, Danelli ALD, Casa RT. (2012) Ciclo da mancha foliar olho-de-rã, na soja. *Revista Plantio Direto*, edição 132, novembro/dezembro.
- Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira WR, Chaves ARM, DaMatta FM (2012) Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102: 892-898.
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Bélanger RR. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93: 535-545.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA. (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice *Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 144-159.
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94: 177-183.
- Roulin S, Buchala AJ. (1995) The induction of  $\beta$ -1,3-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 471-489.

- Sahoo MR, Kole PC, Dasgupta M, Mukherjee A. (2009) Changes in phenolics, polyphenol oxidase and its isoenzyme patterns in relation to resistance in taro against *Phytophthora colocasiae*. *Journal of Phytopathology* 157: 145-153.
- Schuster B, Rétey J. (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 8433-8437.
- Singh A, Singh M. (1993) Cell-wall degrading enzymes in *Orobanche aegyptiaca* and its host *Brassica campestris*. *Plant Physiology* 89: 177-181.
- Siranidou E, Kang Z, Buchenauer H. (2002) Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* Head Blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200-208.
- Taheri P, Tarighi S. (2012) The role of pathogenesis-related proteins in the tomato-*Rhizoctonia solani* interaction. *Journal of Botany* 2012: 1-6.
- Tomás-Barberán F, Iniesta-Sanmartín E, Tomás-Lorente F, Rumbero A. (1990) Antimicrobial phenolic compounds from three *Spanish helichrysum* species. *Phytochemistry* 29: 1093-1095.
- Xavier Filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR. (2011) (2011) Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* 40: 28-38.
- Zieslin N, Ben-Zaken R. (1993) Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 333-339.
- Zucker M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40: 779-784.

## TABELAS E FIGURAS



**Figura 1.** Concentração foliar de silício (Si) em plantas de soja crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de Si (-Si ou +Si, respectivamente) considerando a média das cvs. Bossier e Conquista e das plantas não inoculadas e inoculadas com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*) são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

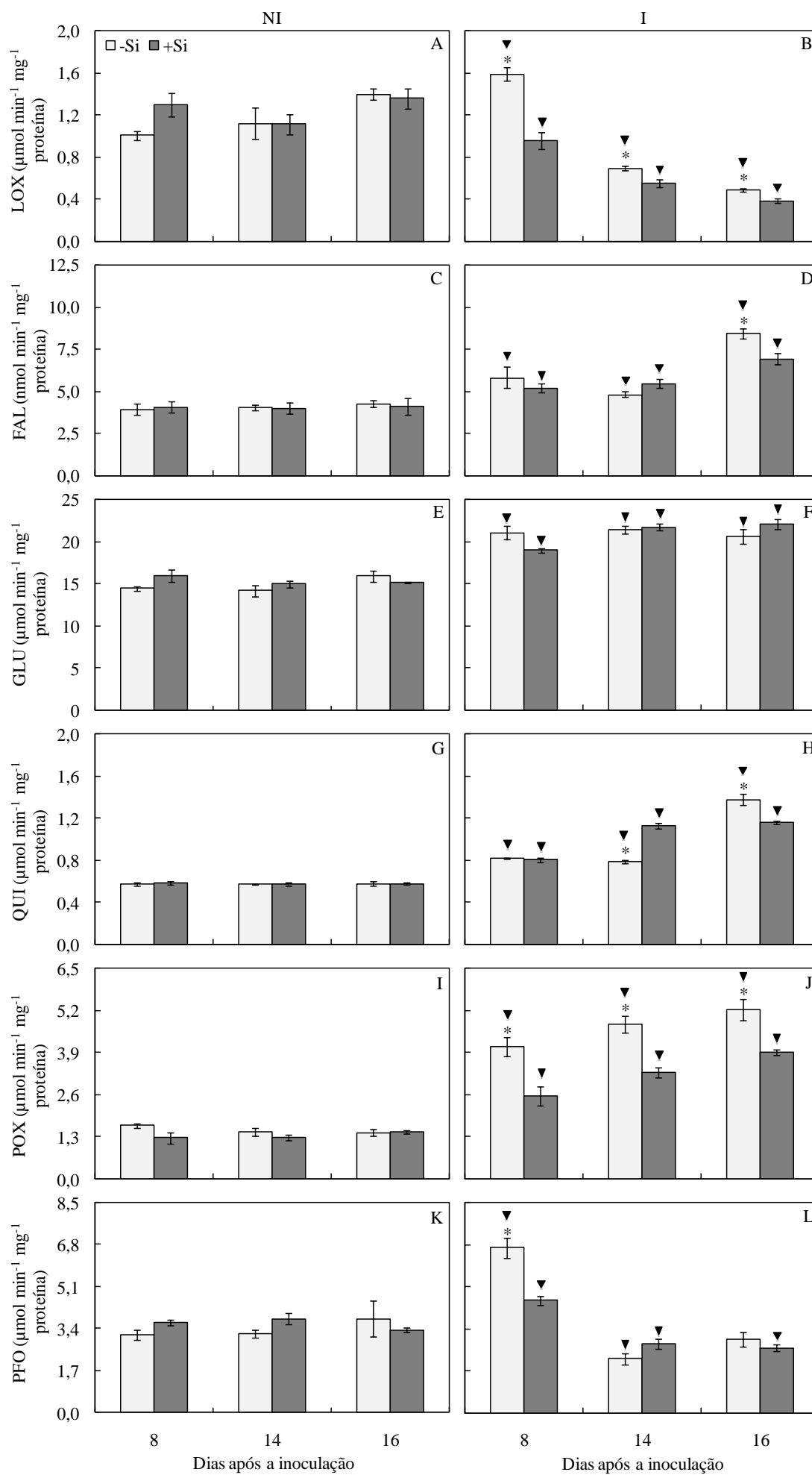


**Figura 2.** Severidade da mancha olho de rã em folíolos de plantas de soja das cvs. Bossier (A) e Conquista (B) crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) aos 16 dias após a inoculação com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*) são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

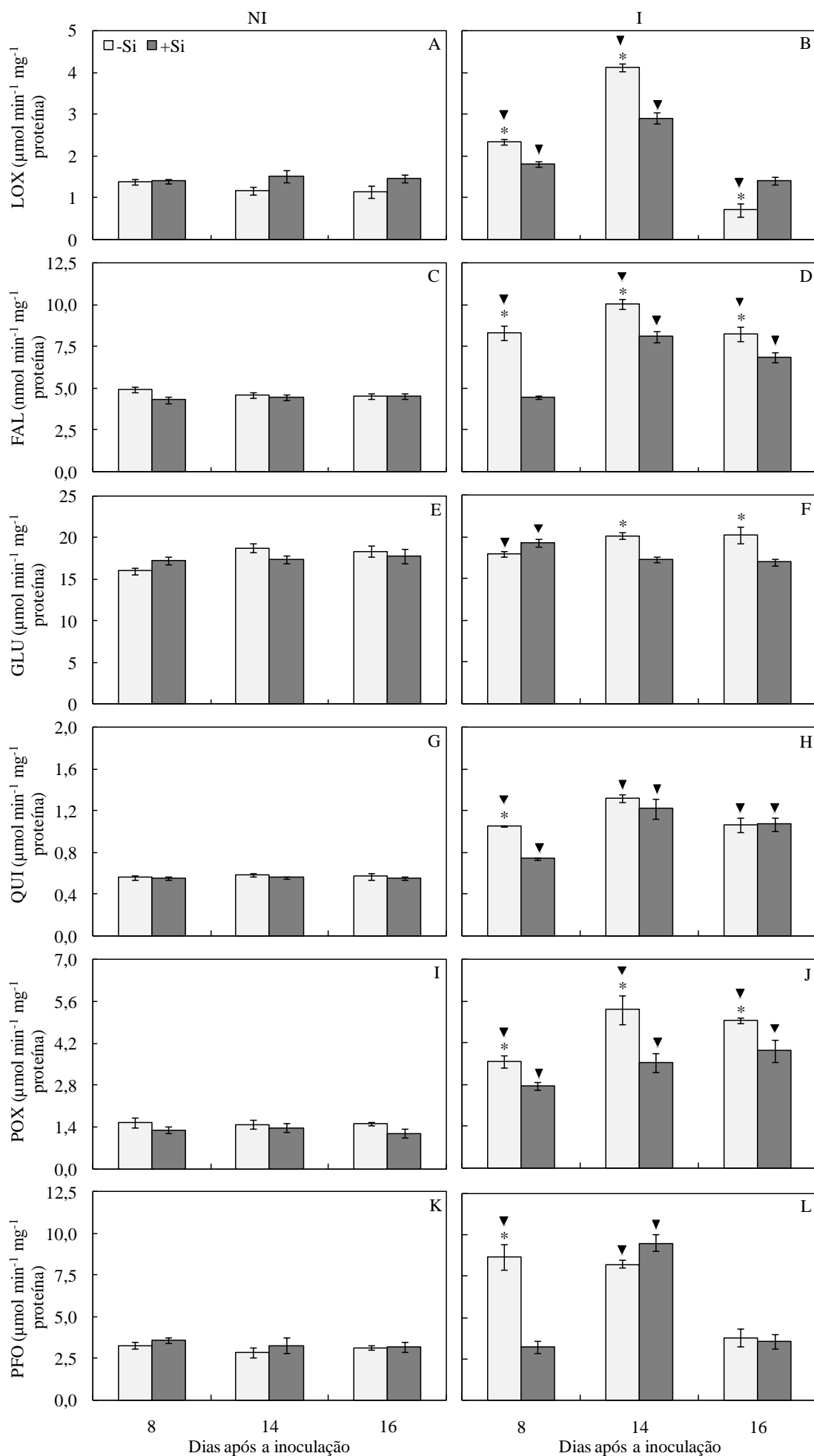
**Tabela 1.** Análise de variância dos efeitos de cultivares (C), inoculação (I), épocas de avaliação (EA) e concentrações de silício (Si) na concentração foliar de silício (CFSi), na severidade da mancha olho de rã (SEV), na atividade das enzimas lipoxigenase (LOX), fenilalanina-amônia-liase (FAL),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), quitinase (QUI), peroxidase ligada ionicamente à parede celular (POX), polifenoloxidase (PFO), celulase (CEL), xilanase (XIL), pectina metil esterase (PME) e poligalacturonase (PG) e nas concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG).

Causas de variação	Valores de $F^z$													
	CFSi	SEV	LOX	FAL	GLU	QUI	POX	PFO	CEL	XIL	PME	PG	CFST	DLATG
C	1,6	<b>202,2</b>	<b>349,3</b>	<b>68,0</b>	0,1	2,9	0,1	<b>59,1</b>	<b>18,2</b>	<b>11,1</b>	<b>31,5*</b>	<b>76,6</b>	0,3	<b>30,3</b>
I	0,1	-	<b>26,0</b>	<b>422,2</b>	<b>224,1</b>	<b>1177,7</b>	<b>877,8</b>	<b>112,0</b>	<b>358,7</b>	<b>127,8</b>	<b>30,9</b>	<b>66,3</b>	<b>7,6</b>	<b>488,5</b>
EA	-	-	<b>72,8</b>	<b>16,2</b>	<b>4,3</b>	<b>49,8</b>	<b>18,0</b>	<b>32,1</b>	<b>64,2</b>	<b>25,0</b>	0,1	<b>16,1</b>	<b>26,6</b>	<b>91,3</b>
Si	<b>384,7</b>	<b>24,9</b>	3,9	<b>40,0</b>	2,3	3,9	<b>76,4</b>	<b>7,8</b>	<b>76,1</b>	<b>40,7</b>	<b>41,8</b>	<b>46,9</b>	<b>4,2</b>	<b>60,3</b>
C × I	0,9	-	<b>241,6</b>	<b>18,4</b>	<b>106,6</b>	<b>8,4</b>	0,1	<b>90,4</b>	<b>57,8</b>	<b>14,1</b>	<b>58,6</b>	<b>64,4</b>	1,8	<b>9,3</b>
C × EA	-	-	<b>87,6</b>	<b>24,7</b>	0,4	<b>30,2</b>	1,6	<b>39,5</b>	1,7	2,4	<b>3,5</b>	<b>8,6</b>	<b>13,1</b>	<b>20,1</b>
C × Si	0,2	<b>19,8</b>	0,3	<b>18,5</b>	<b>6,2</b>	<b>12,7</b>	0,3	1,9	<b>9,3</b>	<b>10,3</b>	<b>40,3</b>	<b>55,2</b>	<b>15,1</b>	<b>16,2</b>
I × EA	-	-	<b>101,9</b>	<b>14,4</b>	0,7	<b>47,8</b>	<b>20,9</b>	<b>32,8</b>	<b>73,7</b>	<b>28,1</b>	<b>4,0</b>	<b>27,4</b>	1,3	<b>73,1</b>
I × Si	0,1	-	<b>31,8</b>	<b>26,8</b>	<b>4,3</b>	2,2	<b>41,0</b>	<b>19,5</b>	<b>60,5</b>	<b>34,2</b>	<b>21,0</b>	<b>50,4</b>	0,5	<b>49,5</b>
EA × Si	-	-	<b>13,1</b>	<b>4,1</b>	<b>3,3</b>	<b>9,5</b>	0,6	<b>23,2</b>	<b>35,3</b>	<b>18,6</b>	<b>3,3</b>	<b>17,5</b>	<b>14,5</b>	<b>17,0</b>
C × I × EA	-	-	<b>65,2</b>	<b>22,8</b>	<b>4,8</b>	<b>27,6</b>	0,7	<b>48,2</b>	2,4	2,3	0,3	<b>10,3</b>	<b>18,5</b>	<b>17,2</b>
C × I × Si	0,1	-	1,4	<b>11,6</b>	0,6	<b>7,4</b>	0,6	2,4	<b>12,7</b>	<b>5,1</b>	<b>26,1</b>	<b>46,4</b>	<b>17,0</b>	<b>11,9</b>
C × EA × Si	-	-	<b>11,2</b>	<b>6,6</b>	<b>8,7</b>	<b>13,4</b>	0,9	<b>5,4</b>	<b>3,9</b>	0,9	1,4	<b>10,9</b>	3,1	<b>3,6</b>
I × EA × Si	-	-	<b>14,4</b>	2,7	1,0	<b>10,6</b>	1,2	<b>24,7</b>	<b>34,3</b>	<b>15,8</b>	<b>3,3</b>	<b>18,2</b>	<b>12,1</b>	<b>14,1</b>
C × I × EA × Si	-	-	<b>13,3</b>	2,6	<b>6,9</b>	<b>13,0</b>	0,8	<b>4,1</b>	<b>4,2</b>	1,0	1,2	<b>21,3</b>	1,1	1,8

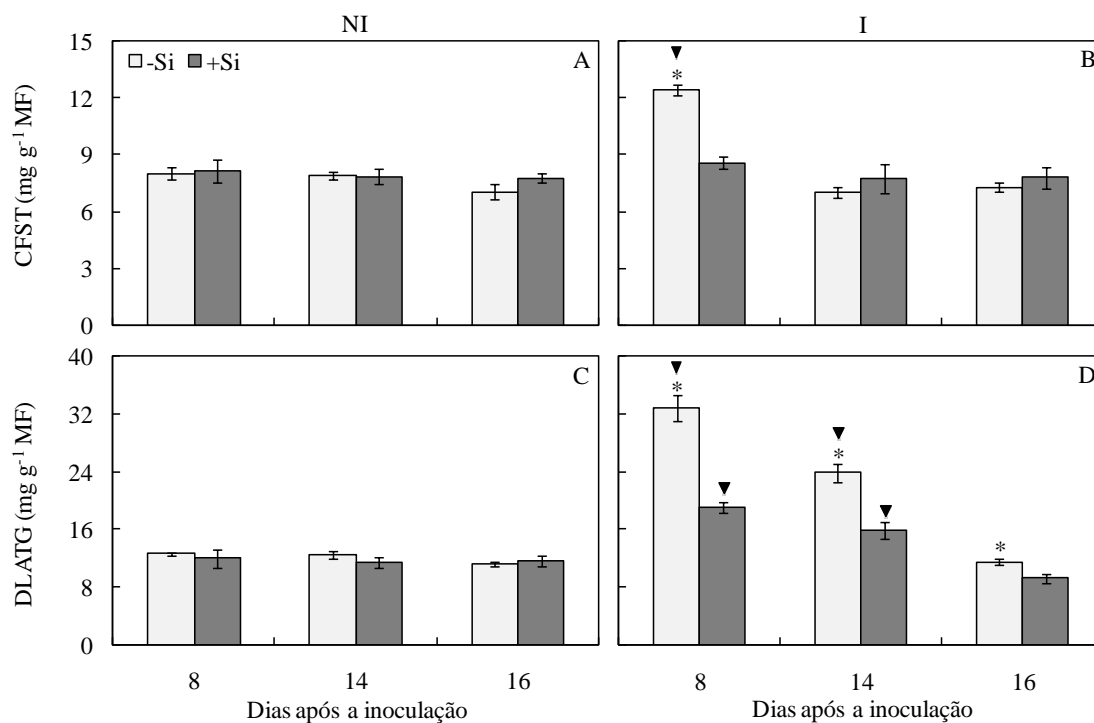
<sup>z</sup> Valores em negrito são significativos ( $P \leq 0,05$ ).



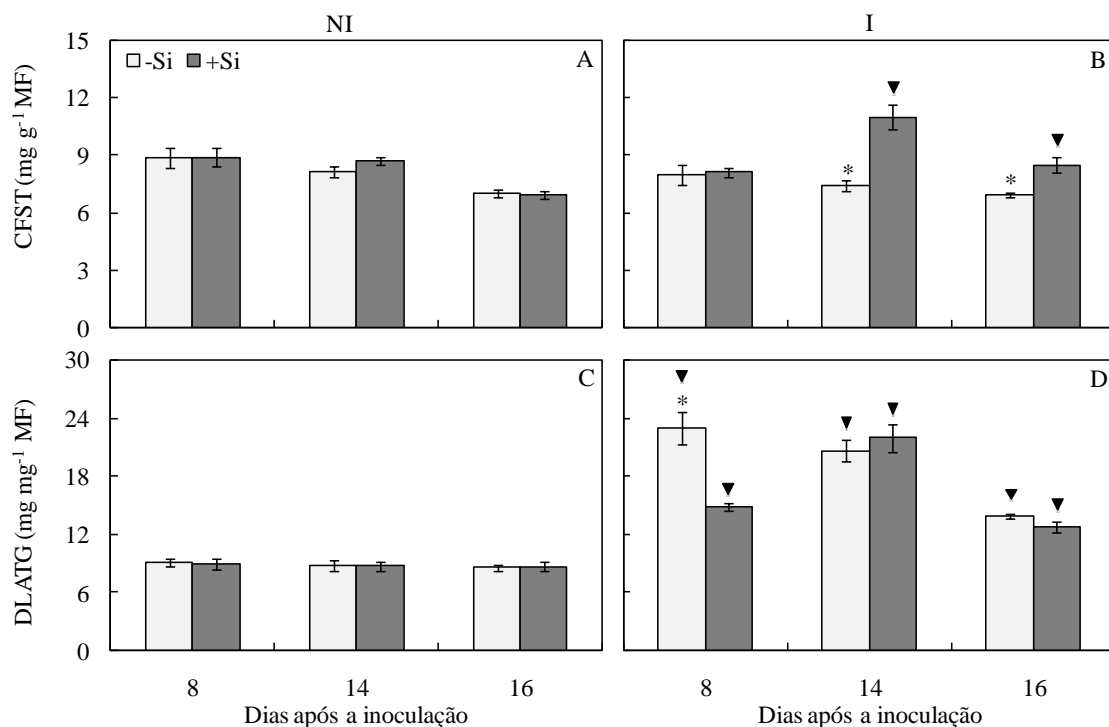
**Figura 3.** Atividades da lipoxigenase (LOX) (A, B), fenilalanina amônia-liase (FAL) (C, D),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) (E, F), quitinase (QUI) (G, H), peroxidase (POX) (I, J) e polifenoloxidase (PFO) (K, L) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I e K) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J e L) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



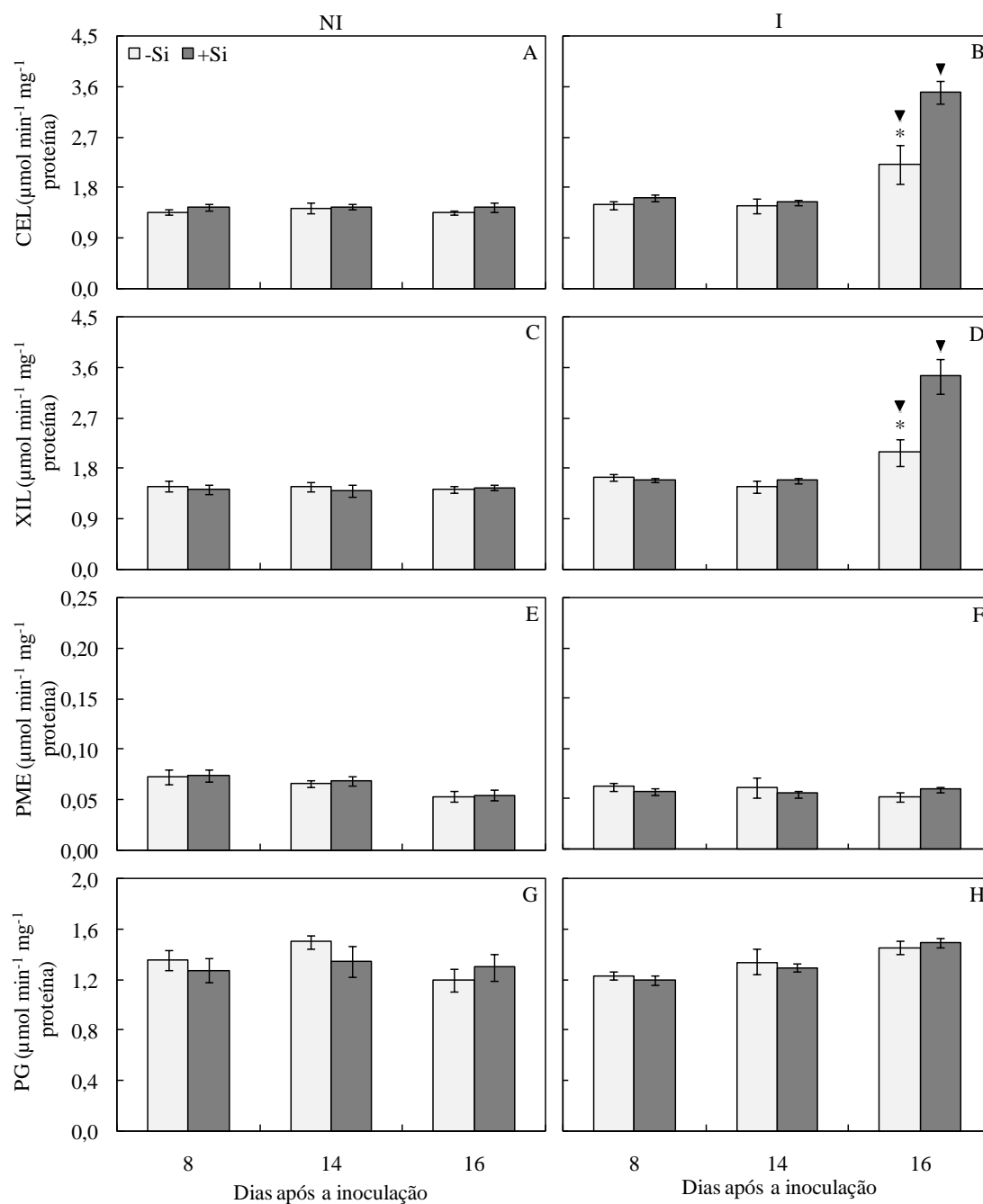
**Figura 4.** Atividades da lipoxigenase (LOX) (A, B), fenilalanina amônia-liase (FAL) (C, D),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) (E, F), quitinase (QUI) (G, H), peroxidase (POX) (I, J) e polifenoloxidase (PFO) (K, L) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E, G, I e K) ou inoculadas (I) (B, D, F, H, J e L) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



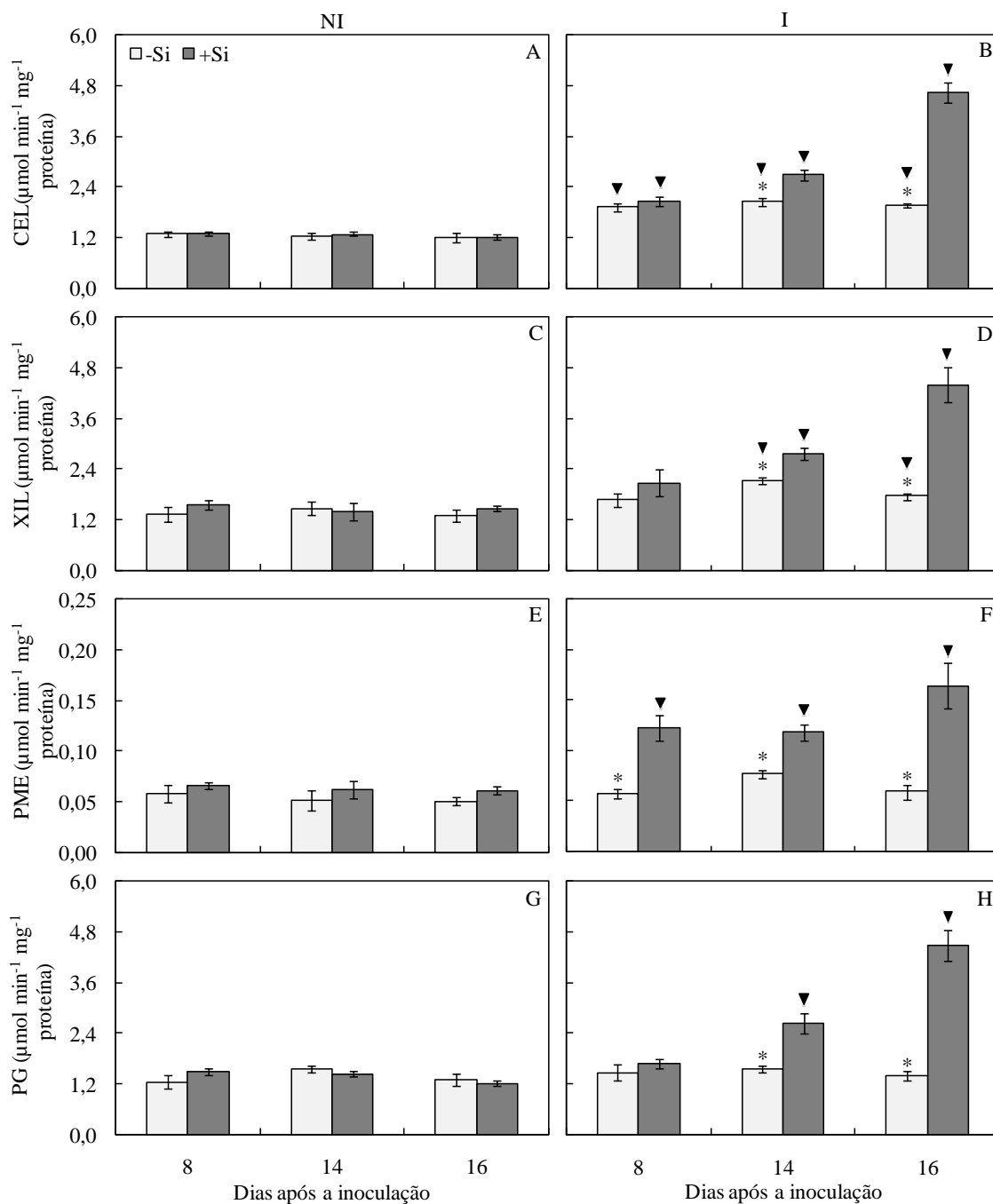
**Figura 5.** Concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) (A, B) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) (C, D) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C) ou inoculadas (I) (B, D) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 6.** Concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) (A, B) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) (C, D) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C) ou inoculadas (I) (B, D) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.



**Figura 7.** Atividades da celulase (CEL) (A, B), xilanase (XIL) (C, D), pectina metil esterase (PME) (E, F) e poligalacturonase (PG) (G, H) em folhas de plantas de soja da cv. Bossier crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E e G) ou inoculadas (I) (B, D, F e H) com *Cercospora soja*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.



**Figura 8.** Atividades da celulase (CEL) (A, B), xilanase (XIL) (C, D), pectina metil esterase (PME) (E, F) e poligalacturonase (PG) (G, H) em folhas de plantas de soja da cv. Conquista crescidas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mM de silício (-Si ou +Si, respectivamente) e não inoculadas (NI) (A, C, E e G) ou inoculadas (I) (B, D, F e H) com *Cercospora sojina*. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco (\*), dentro de cada época de coleta, são significativamente diferentes pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ). Médias dos tratamentos NI e I seguidas por um triângulo (▼), dentro de cada época de coleta e tratamentos -Si e +Si, são significativamente diferentes pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

## CONCLUSÕES GERAIS

Uma vez que o aumento na capacidade antioxidativa regula negativamente a infecção foliar por *C. sojina*, mediante decréscimo na concentração de EROs, é plausível inferir que o mecanismo antioxidante basal menos robusto mediado pelo Si foi determinante para o aumento na suscetibilidade das plantas de soja a *C. sojina*. Ainda, considerando que o aumento na suscetibilidade das plantas da cv. resistente mediado pelo Si não tenha sido suficiente para acarretar limitações fisiológicas, podemos inferir que a menor eficiência fotossintética tenha ocorrido em função da redução da área foliar fotossinteticamente ativa pela formação de inúmeras áreas cloróticas e necróticas. Isso, possivelmente, ocorreu via aumento na concentração intracelular de EROs oriundos de toxinas produzidas pelo patógeno. Adicionalmente, os resultados da presente investigação nos permite inferir que o suprimento de plantas de soja com Si, na ausência de estresse, não modifica os mecanismos bioquímicos clássicos de defesa contra patógenos. Todavia, o contrário ocorreu quando as plantas são submetidas à infecção por *C. sojina*. Nesse caso, nós mostramos que o suprimento das plantas com Si resultou em um sistema bioquímico de defesa menos robusto comparado com o das plantas não supridas com esse elemento. Isso, possivelmente, foi determinante para acarretar a maior suscetibilidade de plantas de soja a *C. sojina*, independente da resistência da cultivar. Outro fator importante para o aumento da suscetibilidade de plantas de soja a *C. sojina* mediado pelo Si foi, possivelmente, a menor capacidade dessas plantas em limitar a degradação da parede celular. Porém, seria interessante a realização estudos adicionais para a completa elucidação do efeito negativo do suprimento de Si às plantas de soja contra a infecção por *C. sojina*.