

RENATA SOUSA RESENDE

**ASPECTOS MICROSCÓPICOS, FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES DO SILÍCIO NA INTERAÇÃO
SORGO – *Colletotrichum sublineolum***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

R433a
2011

Resende, Renata Sousa, 1981-
Aspectos microscópicos, fisiológicos, bioquímicos e
moleculares do silício na interação sorgo –
Colletotrichum sublineolum / Renata Sousa Resende
– Viçosa, MG, 2011.
ix, 80f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

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

1. Silício. 2. *Sorghum bicolor* 3. Sorgo - Resistência a
Colletotrichum sublineolum. 4. Sorgo - Efeito do silício.
5. Antracnose. 6. Enzimas. 7. Fisiologia. 8. Fotossíntese.
9. Microscopia. 10. Sorgo - Metabolismo. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.174945

RENATA SOUSA RESENDE

**ASPECTOS MICROSCÓPICOS, FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES DO SÍLCIO NA INTERAÇÃO
SORGO – *Colletotrichum sublineolum***

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

Aprovada: 28 de janeiro de 2011.

Pesq. Luciano Viana Cota

Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Co-Orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Luiz Antônio Maffia

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues
(Orientador)

À minha Família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e da bolsa de Doutorado Sanduíche na Bélgica.

Em especial ao Prof. Fabrício Ávila Rodrigues, pela amizade, confiança e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Fábio Murilo DaMatta, pela paciência e pelos ensinamentos de fisiologia vegetal.

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CNPMS, Dr. Carlos Roberto Casela e Rodrigo Vêras da Costa, pela oportunidade a mim concebida.

Ao pesquisador Luciano Viana Cota e aos Profs. Luiz Antonio Mafia e Olinto Liparini Pereira, pela participação na banca examinadora.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Bruno pela eterna disponibilidade.

Aos colegas do laboratório de Interação Planta-Patógeno, e de Fisiologia Vegetal pelo apoio, auxílio e companheirismo.

Aos meus pais, sempre presentes em minha vida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

RENATA SOUSA RESENDE, filha de Paulo Sérgio Resende e Sofia Rodrigues de Sousa Resende, nasceu em 24 de setembro de 1981, em Lavras MG.

Em março de 2000 ingressou no curso de agronomia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), graduando-se em janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua dissertação em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua tese em janeiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	4
CAPÍTULO 1	6
Aspectos Microscópicos e Bioquímicos da Resistência do Sorgo à Antracnose Potencializada pelo Silício	7
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados	15
Discussão	16
Referências	19
CAPÍTULO 2	29
Silício influencia a fotossíntese e o metabolismo antioxidativo de plantas de sorgo infectadas por <i>Colletotrichum sublineolum</i>	30
Introdução	30
Material e Métodos	32
Discussão	37
Referências	41
CAPÍTULO 3	49
Manejo da antracnose com silício e fungicida em duas linhagens de sorgo	50
Introdução	50
Material e Métodos	53
Resultados	54
Discussão	56
Referências	57
CAPÍTULO 4	67
Silício na potencialização da resposta hormonal envolvida na resistência do sorgo à antracnose	68
Introdução	68
Material e Métodos	69
Resultado e Discussão	74
Referências	78

RESUMO

RESENDE, Renata Sousa. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2011. **Aspectos microscópicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares do silício na interação sorgo - *Colletotrichum sublineolum***. Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues. Co-orientadores: Francisco Xavier R. do Vale e Carlos Roberto Casela.

Um dos papéis mais importantes do silício (Si) é o aumento da resistência das plantas, especialmente as monocotiledôneas, a patógenos. No entanto, apesar de muitos estudos demonstrarem um papel ativo desse elemento na resistência das plantas às doenças, nada se conhece sobre os múltiplos mecanismos de defesa modulados por esse elemento no patossistema sorgo-*Colletotrichum sublineolum*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Si em reduzir a severidade da antracnose, bem como estudar os aspectos microscópicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares da resistência mediada por esse elemento. Além disso, investigar como o Si afeta a capacidade fotossintética e o metabolismo antioxidativo do sorgo. Para avaliar o efeito da aplicação de Si no solo, em combinação ou não com a aplicação de fungicida, na resistência de duas linhagens de sorgo (BR008 (moderadamente resistente) e BR009 (suscetível)) à antracnose, os experimentos foram conduzidos em condições de campo utilizado como fonte de Si, o silicato de cálcio. Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação de Si reduziu a severidade da antracnose do sorgo e, conseqüentemente, aumentou sua produtividade, especialmente quando se utilizou uma linhagem suscetível tanto no primeiro ano de semeadura quanto no segundo ano (efeito residual da aplicação de silicato no primeiro ano). A maior atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) nas plantas supridas com Si suporta a hipótese de que o mecanismo de defesa exercido por esse elemento não foi apenas a barreira física conforme demonstrou as análises microscópicas. Os parâmetros das trocas gasosas A , g_s e E foram maiores e a concentração de aldeído malônico (MDA) e extravasamento de eletrólitos (EE) foram menores nas plantas supridas com Si e infectadas por *C. sublineolum* em comparação com as plantas

não supridas com esse elemento, sugerindo que o Si manteve a integridade da membrana plasmática das células das folhas. O Si também alterou as vias de sinalização hormonal ativadas por *C. sublineolum*, pois os transcritos dos genes marcadores como ACC oxidase, GH3.1 e também dos genes relacionados com as vias do ácido jasmônico e do ácido salicílico foram induzidos nas plantas inoculadas e supridas com Si. Os resultados deste estudo sugerem que o Si pode interagir com muitos componentes-chave do sistema imune e fisiológico do sorgo, potencializando sua resistência ao patógeno.

ABSTRACT

RESENDE, Renata Sousa. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2011. **Microscopic, physiological, biochemical and molecular aspects of silicon in sorghum - *Colletotrichum sublienolum* interaction.** Advisor: Fabrício Ávila Rodrigues. Co-advisors: Francisco Xavier R. do Vale and Carlos Roberto Casela.

One of the most important roles of silicon (Si) is the increased resistance of plants, especially monocots, against pathogens. However, despite many studies showing an active role of this element in plant resistance to diseases, nothing is known about the multiple defense mechanisms modulated by this element in sorghum-*Colletotrichum sublienolum* pathosystem. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of Si on reducing the severity of anthracnose, as well as to study the microscopic, physiological, biochemical and molecular aspects of resistance mediated by this element. In addition, to investigate how Si affects the photosynthetic capacity of the antioxidant metabolism in sorghum. To evaluate the effect of Si in the soil, in combination or not with the application of fungicide resistance in two sorghum lines (BR008 (moderately resistant) and BR009 (susceptible) to anthracnose, the experiments were conducted under field conditions used as a source of Si, the calcium silicate. The results of this study showed that application of Si reduced the severity of sorghum anthracnose and, consequently, increased productivity, especially using a susceptible line, both in the first year of seeding and second year (residual effect of calcium silicate slag in the first year). The increased activity of defense enzymes peroxidase (POX) and polyphenoloxidase (PPO) in plants supplied with Si supports the hypothesis that the defense mechanism activated by this element does not was just a physical barrier as demonstrated by microscopic analysis. The gas exchange parameters A , g_s and E were higher and the concentration of malonic aldehyde (MDA) and electrolyte leakage (EE) were lower in plants supplied with Si and infected with

C. sublineolum when it were compared with plants not supplied with this element, suggesting that the Si maintained the integrity of the plasmatic membrane of cells of the leaves. The Si also changed the hormonal signaling pathways activated by *C. sublineolum* because the transcripts of marker genes such as ACC oxidase, and also GH3.1 of genes related to the ways of jasmonic acid and salicylic acid were induced in plants inoculated and supplied with Si. The results of this study suggest that the Si can interact with many key components of the immune and physiological sorghum system, increasing their resistance to the pathogen.

INTRODUÇÃO GERAL

A antracnose do sorgo, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* (Ces.) Wilson, é considerada a principal doença dessa cultura em todas as regiões produtoras do mundo, as quais incluem a África, a Ásia e as Américas (Pande et al., 1991). A doença torna-se mais economicamente importante em condições de clima quente e úmido, incluindo o trópico semi-árido, o trópico úmido e as regiões de clima temperado com temperaturas elevadas no verão (Pande et al., 1994; Casela et al., 1997).

No Brasil, a antracnose do sorgo foi relatada pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1934 (Panizzi & Fernandes, 1997) e hoje está presente em todas as áreas produtoras do País, constituindo o principal fator limitante do desenvolvimento da cultura, por ocasionar perdas na produção de grãos e de forragem principalmente em cultivares suscetíveis e em condições ambientais favoráveis (Guimarães et al., 1999). A doença afeta todas as partes da planta, entretanto infecções foliares durante a fase de formação de grãos e infecção nas flores contribuem para maior redução na produção e no peso de grãos. Perdas superiores a 50% da produção de grãos têm sido atribuídas à antracnose foliar, em condições de epidemias severas, principalmente quando há alternância de condições secas e úmidas associadas a temperaturas elevadas (Casela et al., 1997).

A principal estratégia de manejo da antracnose é a utilização de cultivares resistentes (Panizzi et al., 2005). No entanto, o controle genético da antracnose é dificultado pela alta variabilidade de populações desse patógeno (Ali & Warren 1987; Cardwell, 1989; Pande, 1991). A resistência genética, embora seja a medida de controle mais aplicável, não deve ser usada isoladamente e sim como um componente do pacote tecnológico da cultura. Nesse contexto, é importante o desenvolvimento de alternativas de controle que poderão auxiliar em programas de manejo integrado da antracnose do sorgo.

Os nutrientes minerais exercem funções específicas no metabolismo vegetal, afetando o crescimento e a produção, bem como alterando a morfologia e a anatomia celular e a composição química, podendo aumentar ou reduzir a resistência das plantas aos patógenos (Marschner, 1995). A resistência das plantas às doenças, apesar de ser geneticamente controlada, pode ser influenciada pelos fatores ambientais. A nutrição mineral é um fator ambiental de fácil manipulação para o controle de doenças de plantas, entretanto, é necessário conhecer como os nutrientes minerais aumentam ou diminuem a resistência das plantas aos patógenos ao afetarem o processo de patogênese.

O silício (Si) ocupa 27%, em massa, da composição da crosta terrestre, sendo superado apenas pelo oxigênio. Algumas plantas são beneficiadas pelo Si, principalmente aquelas pertencentes às famílias Poaceae, Equisetaceae e Cyperaceae. As dicotiledôneas acumulam menos de 0,1% de Si; os cereais de inverno (como o trigo, a aveia, o centeio e a cevada) e a cana-de-açúcar chegam a acumular mais de 1%, e as gramíneas de ambiente aquático, como o arroz, acumulam acima de 5% de Si na matéria seca (Epstein, 1994). Definem-se como acumuladoras de Si aquelas espécies vegetais capazes de concentrar acima de 1% de Si na matéria seca (Epstein, 1994), a exemplo do arroz, do sorgo e certas espécies de cavalinha (*Equisetum* sp.). Epstein (1994) ressalta que plantas crescendo em ambiente rico em Si devem diferir daquelas presentes em ambientes deficientes nesse elemento, principalmente quanto à composição química, resistência mecânica das células, características de superfície foliar, tolerância ao estresse abiótico, e ao ataque de fungos e pragas. Pelo fato de estar amplamente distribuído na natureza, torna-se difícil comprovar, cientificamente, a sua essencialidade às plantas. O fato mais importante atualmente é que a Legislação Brasileira de Fertilizantes passou a considerar o Si como um micronutriente benéfico às diversas culturas e sua incorporação aos fertilizantes NPK tornou-se obrigatória de acordo com o Decreto Lei 4.954 de 14 de Janeiro de 2004.

O silício (Si), embora seja um dos elementos minerais mais abundantes na natureza, não é considerado essencial às plantas. Um benefício atribuído ao Si às plantas é o controle de doenças fúngicas em culturas economicamente importantes. Em arroz, a brusone (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr), a mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi in Ito) Drechs ex Dastur), a podridão

do colmo (*Magnaporthe salvinii* Catt.), a escaldadura (*Monographella albescens* Theum), a queima das bainhas (*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk) e a discoloração dos grãos (causada por espécies de *Bipolaris*, *Fusarium*, entre outros fungos) tiveram suas intensidades significativamente reduzidas após a aplicação de Si no solo (Datnoff et al., 1997; Savant et al., 1997; Rodrigues et al., 2001, 2003). O Si também controlou o míldio pulverulento em alguns cereais de inverno como o trigo, a cevada e o centeio (Rodgers-Gray & Shaw, 2000) e a antracnose do sorgo (Resende et al., 2009). O Si também tem efeito positivo o controle de doenças em dicotiledôneas tais como, o míldio pulverulento (*Podosphaera xanthii*) em abóbora, a podridão das raízes (*Pythium ultimum*) e a murcha-de-Fusário em pepino, o míldio pulverulento (*Uncinula necator*) da videira e o oídio da roseira (Miyake & Takahashi, 1983; Bowen et al., 1992; Menzies et al., 1992; Chérif et al., 1992; Bélanger et al., 1995).

O efeito do Si na restrição do parasitismo tem sido bem documentado, mas os mecanismos pelos quais esse elemento exerce suas propriedades profiláticas ainda não estão totalmente entendidos. Dois mecanismos que explicam o aumento da resistência conferida pelo Si são propostos. Do ponto de vista morfológico, a deposição e polimerização do ácido silício abaixo da cutícula formam uma camada dupla cutícula-sílica (Yoshida, 1965). Essa camada pode impedir mecanicamente a penetração pelo fungo e interromper o processo de infecção. No entanto, alguns pesquisadores hesitam em aceitar que apenas a hipótese da barreira mecânica esteja ligada à resistência pelo fato que o fungo poderá penetrar a epiderme por meio de atividade enzimática (Ishiguro, 2001). Outro mecanismo proposto é que o Si solúvel tenha um papel biologicamente ativo potencializando a expressão de mecanismos de defesa das plantas com o acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (Chérif et al., 1992; 1994; Fawe et al., 1998; Rodrigues et al., 2003; 2004; 2005). No entanto, a exata natureza da interação do Si solúvel com as vias bioquímicas de defesa da planta permanece desconhecida.

Referências

- Ali, M. E. K., and Warren, H. L. 1987. Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. *Plant Disease*. 71:402-404.
- Bélanger RR, Bowen PA, Ehret DL, Menzies JG (1995) Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* 79, 329-336.
- Bowen, P., Menzies, J. Ehret, D. 1992. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117:906-912.
- Cardwell, K. F., Hepperly, P. R., and Frederiksen, R. A. 1989. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease*. 73:255-257.
- Casela, C. R., Pinto, M. F. J. A., Oliveira, E., Ferreira, A. S. Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. IN: Vale, F. X. R., Zambolim, L. (eds.). Controle de doenças de plantas. Viçosa, MG: Departamento de Fitopatologia, p.1025-1064. 1997.
- Cherif, M., Asselin, A. and Belanger, R. R. (1994) Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* 84, 236–242.
- Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R. 1992. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:411-425.
- Datnoff, L. E., Deren, C. W., and Snyder, G. H. 1997. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Prot.* 16:525-531.
- Epstein, E. (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11 17.
- Fawe, A., Abou-zaid, M., Menzies, J.G., Bélanger, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* 88:396-401. 1998.
- Guimarães, F. B., Casela, C. R., Santos, F. G., Pereira, J. C. R., Ferreira, A. S. 1999. Avaliação da resistência de genótipos de sorgo a antracnose. *Summa Phytopathologica* 25:308-312.
- Ishiguro, K. 2001. Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. Pages 277-291 in: *Studies in Plant Science*, Vol. 8. Silicon in Agriculture. L. E. Datnoff, G. H. Snyder, and G. H. Korndörfer, eds. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Marschner, H. 1995. Beneficial mineral elements. Pages 405-435 in: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

- Menzies, J., Bowen, P., Ehret, D., Glass, A. D. M. 1992. Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117:902-905
- Pande, S., Mughogho, L. K., Badhiopadhyay, R., and Karunakar, R. I. 1991. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease*. 75:778-783.
- Pande, S., Mughogho, L. K., Badhiopadhyay, R., Karunakar, R. I. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease* 75:778-783. 1991.
- Pande, S., Thakur, R. P., Karunakar, R. I., Bandyopadhyay, R., Reddy, B. V. S. Development of screening methods and identification of stable resistance to anthracnose in sorghum. *Field Crops Research* 38:157-166. 1994.
- Panizzi, R. C.; Fernandes, N. G. Doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). In: Camargo, E. A., Rezende, J. A. M. (eds.). *Manual de Fitopatologia - Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.676-689. 1997.
- Resende, R. R., Rodrigues, F. A., Soares, J. M., and Casela, C. R. 2009. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal of Plant Pathology* 124:533-541.
- Rodrigues, F. A., Datnoff, L. E., Korndörfer, G. H., Seebold, K. W., and Rush, M. C. 2001. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Dis*. 85:827-832.
- Rodrigues, F. A., Jurick, W. M., Datnoff L. E., Jones J. B., Rollins J. A. 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66:144-159.
- Rodrigues, F. A., McNally, D. J., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*. 94:177-183.
- Rodrigues, F.A., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J. B., and Bélanger, R. R. 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance.
- Savant, N. K., Snyder, G. H., and Datnoff, L. E. 1997. Silicon management and sustainable rice production. *Adv. Agron*. 58:151-199.
- Yoshida, S. 1965. Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science Series*. 15:1-58.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS MICROSCÓPICOS E BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO SORGO À ANTRACNOSE POTENCIALIZADA PELO SILÍCIO

Aspectos Microscópicos e Bioquímicos da Resistência do Sorgo à Antracnose Potencializada pelo Silício

Resumo

O uso do Si nas plantas tem despertado cada vez mais o interesse dos pesquisadores devido aos seus inúmeros benefícios principalmente sob condições de estresse. O aumento da resistência das plantas às doenças promovidas pelo Si é associado principalmente à sua alta deposição nos tecidos e ativação de mecanismos de defesa. No entanto, o exato mecanismo que o Si atua aumentando a resistência das plantas ainda é desconhecido. Dessa forma, este trabalho teve como principal objetivo elucidar a resistência do sorgo a antracnose do ponto de vista microscópico e bioquímico. Nas análises microscópicas pôde-se observar que, nas folhas das plantas supridas com Si além da alta deposição de Si encontrada no sítio de infecção do patógeno, os acérvulos foram menores e em número reduzido quando comparados com as folhas das plantas não supridas com Si. Além disso, a atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) foram maiores nas folhas das plantas supridas com Si. Portanto o Si, além de atuar como uma barreira física, também está envolvido, de certa forma, em atividades metabólicas, especialmente em plantas submetidas a condições de estresse.

Palavras-chaves: microscopia, enzimas, *Colletotrichum sublineolum*, silício

Introdução

As plantas estão constantemente expostas ao ataque de patógenos. No entanto, por possuírem inúmeros mecanismos de defesa, ativos e/ou passivos, somente alguns microrganismos são capazes de infectá-las e causar doença. A tentativa de infecção das plantas pelos patógenos comumente ativa mecanismos de defesas multicomponentes que incluem a produção de derivados da rota dos fenilpropanóides (Dixon & Paiva, 1995), modificação da parede celular (Brisson et al., 1994), produção de lignina (Bruce & West, 1988) e produção de proteínas relacionadas com a patogênese (PR) (Van Loon et al., 1994). No sorgo, a principal resposta de defesa ao estresse biótico é a produção de fitoalexinas que

estão localizadas nos sítios de infecções do patógeno, as quais pertencem ao grupo das antocianinas (Nicholson et al., 1987, 1988). No entanto, deve-se levar em consideração que os mecanismos de defesa do sorgo são complexos e que mais de um fator está envolvido nas respostas de defesa aos patógenos.

O sorgo é ranqueado como o quinto cereal de maior importância econômica no mundo e tem sido utilizado na alimentação humana e animal, além de ser uma fonte para a produção de biocombustíveis (Sasaki & Antonio, 2009). No entanto, apesar de sua importância, a produtividade ainda está aquém do potencial da cultura nas principais áreas produtoras. Um dos fatores que tem contribuído para essa baixa produtividade é a ocorrência de doenças. Dentre elas, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum*, é a mais importante devido à ocorrência em todas as regiões produtoras desta gramínea e pelas altas perdas que provoca (Frederiksen, 1984). A principal estratégia de controle dessa doença é a resistência genética, porém sua utilização é difícil devido à alta variabilidade na população do patógeno (Ali & Warren 1987; Cardwell, 1989; Pande, 1991). É sabido que o fornecimento de silício (Si) às plantas, principalmente as monocotiledôneas, tem contribuído de forma eficiente para o controle de várias doenças (Datnoff et al., 2007). Portanto, essa medida alternativa de controle tem ganhado cada vez mais aceitação e é promissora aos produtores de sorgo, considerando-se os enormes prejuízos que a antracnose tem causado à produção dessa cultura.

O Si, apesar de não ser considerado essencial para o crescimento das plantas, pode ser absorvido pelo arroz em níveis que excedem os dos macronutrientes (Epstein, 1999). Essencial ou não, o papel do Si nas plantas tem sido cada vez mais de interesse aos pesquisadores devido aos seus inúmeros benefícios principalmente sob condições de estresse. Vários estudos têm mostrado o efeito do Si no controle de doenças em muitos patossistemas (Datnoff et al., 2007; Resende et al., 2009; Domiciano et al., 2009; Dallagnol et al., 2010). Dois mecanismos que explicam o aumento da resistência conferida pelo Si são propostos na literatura. Do ponto de vista morfológico, a deposição e polimerização do ácido monossilícico abaixo da cutícula formam uma camada dupla cutícula-sílica (Yoshida, 1965). Essa camada pode impedir mecanicamente

a penetração pelo fungo e interromper o processo de infecção. No entanto, alguns pesquisadores hesitam em aceitar que apenas a hipótese da barreira mecânica esteja ligada à resistência pelo fato que o fungo poderá penetrar a epiderme por meio de atividade enzimática (Ishiguro, 2001). Outro mecanismo proposto é que o Si solúvel tenha um papel ativo, potencializando mecanismos de defesa das plantas com o aumento na produção de compostos fenólicos, aumento nos níveis de algumas classes de fitoalexinas e também potencializando a ativação de alguns genes que codificam proteínas PR (Chérif et al., 1994; Rodrigues et al., 2003, 2004, 2005). No entanto, a exata natureza da interação entre o Si solúvel com as vias bioquímicas de defesa da planta permanece desconhecida.

Assim, levando em consideração a importância do Si na resistência das plantas às doenças e que os mecanismos pelos quais esse elemento atua aumentando essa resistência são complexos e não totalmente entendidos, esse trabalho teve como principal objetivo elucidar a resistência do sorgo a antracnose do ponto de vista microscópico e bioquímico.

Material e Métodos

Preparação da solução nutritiva: a solução nutritiva foi preparada segundo Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações: 3,0 mM KNO₃; 0,5 mM NH₄H₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄·7H₂O; 2,0 mM Ca(NO₃)·4H₂O; 0,30 μM CuSO₄·5H₂O; 0,33 μM ZnSO₄·7H₂O; 11,5 μM H₃BO₃; 3,5 μM MnCl₂·4H₂O; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 50 μM FeSO₄·7H₂O e 50 μM EDTA bissódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410) (Ma et al., 2002) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol Si/L (+Si).

Crescimento das plantas de sorgo: sementes da linhagem de sorgo CMSXS142 [BR 009 (Tx623) - Texas], suscetível à antracnose (Carlos R. Casela, Comunicação Pessoal), foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por dois minutos, seguidas de lavagem em água destilada por três minutos e germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidos a 25°C por 6 dias. Cinco plântulas foram transferidas para vasos plásticos de 5 litros contendo

solução nutritiva 1/2 de força iônica da solução anteriormente citada, mas sem adição de Si. Após 7 dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total, adicionando-se ou não o ácido monossilícico. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

Obtenção do inóculo de *C. sublineolum* e inoculação das plantas: as plantas de sorgo foram inoculadas com um isolado monospóricico de *C. sublineolum* (CNPMS-12) fornecido pelo Laboratório de Resistência à Doenças da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG. O isolado de *C. sublineolum*, armazenado em tubos de ensaio com BDA contendo óleo mineral, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (aveia 60 g/L e ágar 17g/L). Após a repicagem do fungo, as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C, onde permaneceram por até 10 dias até ocorrer abundante crescimento micelial. Em seguida, foi feita uma raspagem superficial do micélio e as placas foram transferidas para câmara de crescimento com luz constante e temperatura de 25°C para ocorrer a esporulação do fungo. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 ml de água destilada em cada placa fazendo-se uma raspagem superficial, com espátula, para liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de 1×10^6 conídios/mL, pela contagem em hemacitômetro, contendo Tween 20 (0,1 ml/100 ml de suspensão). As plantas crescidas em casa de vegetação foram inoculadas aos 30 dias de idade. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro a 25°C e umidade relativa de $\approx 90\%$. Após 18 h no escuro, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 26°C e umidade relativa de $\approx 50\%$ onde permaneceram até o final das avaliações.

Avaliação da severidade da antracnose: a severidade foi avaliada aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (dai) das plantas, na quinta e sexta folha a partir da base, utilizando-se a escala diagramática de Sharma (1983).

Determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa do sorgo à antracnose: amostras da quinta e da sexta folhas a partir da base, de cada planta das repetições de cada tratamento foram coletadas às 24, 48, 72 e 96 horas após a

inoculação (hai). Amostras de folhas coletadas de plantas não inoculadas (0 h) com *C. sublineolum* serviram como controle. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido durante a coleta e armazenadas a -80°C até serem analisadas.

Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7): o extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,2 g de folhas em nitrogênio líquido seguida de homogeneização em 2 ml do meio de extração composto de: 0,1 M tampão fosfato de potássio (pH 6,8); 1 mM fenilmetilsulfonilflúor (PMSF); 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeinizado foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. A atividade da POX foi determinada conforme metodologias propostas por Chance & Maehley (1955) e Kar & Mishra (1976). No ensaio colorimétrico, utilizou-se pirogalol como substrato e peróxido de hidrogênio. A cada 3 ml do extrato de reação, foi adicionado 950 µl de água destilada, 750 µl do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 600 µl de pirogalol 100 mM, 600 µl de peróxido de hidrogênio 100 mM e 100 µL do extrato. As leituras de absorvância foram realizadas a 420 nm a cada 10 segundos durante um minuto. A atividade da POX foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $2,47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Chance & Maehley, 1955). A atividade da POX foi expressa em mol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Atividade de polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1): a obtenção do extrato enzimático e a determinação da atividade da PFO foi determinada da mesma forma que para POX, exceto que apenas o pirogalol a 100 mM foi utilizado como substrato. As leituras de absorvância foram realizadas a 420 nm a cada dez segundos durante um minuto. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Chance & Maehley 1955).

Atividade de quitinases (QUI, EC 3.2.1.14): o extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,2 g de folhas em nitrogênio líquido seguida de homogeneização em 1 ml do meio de extração composto de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), 1 mM PMSF e 200 mg de PVPP. O homogeinizado foi centrifugado a $20.000 \times g$ por 25 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático.

A determinação da atividade da QUI foi feita conforme metodologia proposta por Roberts & Selitrennikoff (1988), modificada por Harman et al. (1993), utilizando-se como substrato o *p*-nitrofenil- β -D-*N*-*N'*-diacetilquitobiose (PNP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O meio de reação contendo 470 μ L de 50 mM tampão acetato de sódio (pH 5,0), 10 μ L de PNP a 2 mg/mL e 20 μ L do extrato vegetal foi incubado a 37°C, por 2 h. A reação foi parada acrescentando-se 0,5 mL de 0,2 M de carbonato de sódio. As leituras de absorbância foram realizadas a 410 nm imediatamente após a parada das reações. Foi utilizado para o cálculo o coeficiente de extinção molar de $7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a atividade da QUI expressa em mM de *p*-nitrofenil produzido por $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Yedidia et al., 1999).

Atividade de β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.6): O extrato enzimático foi obtido da mesma forma que para a QUI. A atividade da GLU foi determinada conforme metodologia descrita por Lever (1972) com algumas modificações. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi usado em substituição à hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (Miller, 1956). O meio de reação constituído de 230 μ L de 100 mM tampão acetato de sódio (pH 5,0), 250 μ L da solução de substrato da laminarina a 4 mg/mL e 20 μ L do extrato vegetal foi incubado a 45°C por 30 min. Após esse período, acrescentou-se ao meio de reação 1 ml de DNS e, em seguida, esta mistura foi aquecida a 100°C por 5 min. Após o resfriamento em gelo até a temperatura de 30°C, as amostras tiveram absorbância determinada a 540 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas utilizada para o cálculo da atividade das enzimas foi obtida pelo método de Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão.

Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST): amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas em nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas a -80°C até análise. Amostras de 0,1 g representativas do material foliar foram maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos plásticos para microcentrífuga, homogeneizado com 1,5 ml de metanol 80% e extraído durante 12 h em mesa agitadora orbital (150 rpm) à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$). Os tubos foram cobertos com papel alumínio para proteger o extrato metanólico da

oxidação pela luz. O extrato metanólico verde escuro foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 5 min e, após centrifugação, o sobrenadante foi transferido pra um novo tubo e o resíduo mantido a -80°C para determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. A metodologia proposta por Zieslin & Ben-Zaken (1993), com algumas modificações, foi usada para determinação da concentração de CFST. Adicionou-se 150 μl do reagente “Folin & Ciocalteau’s Phenol” 0,25 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 150 μl do extrato metanólico. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) por 5 min. Posteriormente, 150 μl de carbonato de sódio 1 M foram adicionados à mistura, a qual foi homogeneizada novamente e mantida a temperatura ambiente. Após 10 min, adicionou-se 1 ml de água destilada à mistura que permaneceu em temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) por 30 min. A absorbância das amostras foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (Hitachi U3000). A concentração de CFST foi expresso em mg de compostos fenólicos (expresso em catecol) por kg de folha fresca.

Determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico

(DLATG): adicionou-se 1,5 ml de água estéril ao resíduo obtido após a extração dos CFST. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65°C por ≈ 12 h. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi usado para determinação de lignina de acordo com a metodologia de Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 ml da solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e HCl 2 N (1:10) foi adicionado ao resíduo seco. Os tubos foram levemente agitados para hidratar o resíduo e, em seguida, foram colocados em banho-maria (100°C). Após 4 h, os tubos foram colocados no gelo por 10 min. A mistura foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 ml de água destilada estéril seguido de centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 1,5 ml de NaOH 0,5 N. A mistura foi agitada em mesa agitadora orbital (150 rpm) a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) por 12 h. A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Após a adição de

200 µl de HCL concentrado ao sobrenadante, os tubos foram transferidos para uma bandeja com gelo e mantidos na geladeira (4°C) por 4 h para precipitação dos DLATG. Após a centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, de cor laranja-amarronzado, foi dissolvido em 2 ml de NaOH 0,5 N. A leitura da absorbância foi realizada a 290 nm em espectrofotômetro (Hitachi U3000). A concentração dos DLATG foi expressa em mg kg^{-1} de folha fresca utilizando-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Microscopia eletrônica de varredura: um total de cinco fragmentos de folhas ($\approx 5 \text{ mm}^2$) das plantas de cada tratamento foram coletados às 120 hai. Os fragmentos obtidos foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo glutaraldeído 2,5% e armazenados em geladeira. Após quinze dias, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato de sódio por quatro vezes durante 10 min cada e desidratados em uma série alcoólica de 30, 50 e 70%, com intervalos de 10 min entre as trocas, sendo realizadas três passagens na última concentração no mesmo intervalo de tempo. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante duas horas à temperatura ambiente. Após uma nova desidratação em uma série alcoólica de 80, 95 e 100%, os fragmentos foram submetidos à secagem no ponto crítico (Balzers, modelo CPD020) e as amostras foram montadas sobre suportes metálicos de alumínio previamente cobertos com fita adesiva de dupla face. Em seguida, os fragmentos foram cobertos com ouro por meio de metalização no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit” (Balzers, FDU010) e, posteriormente, analisados no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (LEO, modelo 1430VP) operado a 10 kv para obtenção das eletromicrografias.

Microanálise de raios-X da deposição foliar de Si: um total de três fragmentos de folhas ($\approx 50 \text{ mm}^2$) contendo sítios de infecções de *C. sublineum* foram obtidos das plantas de cada tratamento às 120 hai. Os fragmentos obtidos foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo glutaraldeído 2,5% e armazenados a 4°C por 5 dias. Após esse período, as amostras foram lavadas em

tampão cacodilato de sódio seguida por água destilada. Em seguida, as folhas foram montadas em stubs de alumínio e cobertas com ouro e paládio para dar condutividade às amostras. As amostras foram observadas no MEV, acoplado a um CAMECA SX-100 Universal EPMA (Cameca Instruments Inc., Trumbull, CT, USA), operando a uma voltagem de 15 kV e na corrente de 20 nA

Delineamento experimental e análises estatística: Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os experimentos foram repetidos uma vez. Cada unidade experimental foi composta por uma planta. As médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o test-t SAS versão 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Resultados

Progresso da antracnose: a severidade da antracnose nas folhas das plantas não supridas com Si foi crescente dos 3 até aos 10 dai quando atingiu 100% (Fig. 1). Nas folhas das plantas supridas com Si, o progresso da antracnose foi mais lento com severidade máxima de 20% aos 10 dai (Fig. 1).

Atividades enzimáticas: nas folhas das plantas de sorgo supridas com Si houve aumento significativo ($P \leq 0,05$) na atividade da POX às 48 e 96 hai. Esse aumento foi de 140 e 75% maior em relação às plantas não supridas com Si (Fig. 2). A atividade da PPO seguiu a mesma tendência da POX, com significativo aumento ($P \leq 0,05$) nas folhas das plantas supridas com Si às 48 e 96 hai, cerca de 127 e 58% maior do que nas plantas não supridas com Si (Fig. 2). A atividade da GLU apresentou aumento às 24 hai e manteve atividade alta até as 96 hai nas folhas das plantas supridas ou não com Si sem diferença significativa ($P = 0,05$) entre esses tratamentos (Fig. 3). A atividade da QUI foi crescente após a inoculação das plantas supridas ou não com Si. As plantas não supridas com Si apresentaram aumento significativo ($P \leq 0,05$), respectivamente, de 57, 40 e 67% na atividade da QUI às 24, 48 e 72 hai em relação às plantas supridas com Si (Fig. 3).

Concentração de CFST e DLATG: a concentração de CFST aumentou às 24 hai seguido de decréscimo até as 72 hai e um ligeiro aumento até as 96 hai, porém sem diferenças significativas entre as plantas supridas ou não com Si (Fig. 4). A

concentração de DLATG aumentou a partir das 48 hai nas plantas supridas ou não com Si (Fig. 4). Porém, este aumento foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) às 72 hai nas plantas não supridas com Si (Fig. 4).

Análise microscópica e de microanálise de raios-X: nas folhas das plantas não supridas com Si, observou-se extensas lesões necróticas de coloração palha com margens avermelhadas contendo inúmeros acérvulos (Fig. 5A). Nas folhas das plantas supridas com Si, as lesões foram menores e não coalesceram, além do que a pigmentação foi intensa ao redor dos sítios de infecção (Fig. 5B). Nas análises de raios-X, observou-se que a deposição de Si nas folhas das plantas não supridas com Si foi de menor intensidade (Fig. 5C), enquanto que nas folhas das plantas supridas com Si houve um padrão uniforme na deposição do elemento nos sítios de infecção, ao redor dos tricomas e nas células silicatadas (idioblastos especializados) (Fig. 5D). Nas folhas das plantas não supridas com Si, observou-se ruptura da cutícula com o surgimento dos acérvulos contendo conídios e setas (Fig. 5E-F). Nas folhas das plantas supridas com Si, as lesões não expandiram, os acérvulos foram reduzidos em número e produziram poucos conídios (Fig. 5G-H).

Discussão

Este trabalho mostra as primeiras informações das respostas microscópicas e bioquímicas de defesa do sorgo à infecção por *C. sublineolum* potencializadas pelo Si. Com a microanálise de raios-X foi possível observar uma maior deposição de Si nos sítios de infecção, enquanto que ao redor dos tricomas e nas células silicatadas (idioblastos especializados) essa deposição foi menos acentuada. O Si é absorvido pelas plantas na forma de ácido monossilícico, o qual é translocado das raízes para as folhas via transpiração polimerizando-se nos espaços extracelulares, nas paredes das células da epiderme (local de alta evapotranspiração) e nas células basais dos tricomas (Bélanger et al., 2003; Samuels et al., 1991). Deve-se ressaltar, no entanto, que no sorgo uma grande quantidade de Si também é encontrada nas células silicatada (idioblastos especializados em formato de halteres (“dumb-bell”) que se distribuem regularmente em fileiras na epiderme da folha e nas nervuras (Sangster, 1970; Esau, 1977). Neste contexto, a primeira teoria que tentou explicar o modo de ação

do Si envolvia uma barreira mecânica contra a penetração de patógenos e de fato vários trabalhos utilizando a técnica de microanálise de raios-X demonstraram que a deposição da sílica insolúvel na parede celular e nas papilas contribuiu para fortalecer os locais de penetração dos patógenos (Carver et al 1998; Perumalla & Heath, 1991; Samuels et al., 1994; Stein et al., 1993). No entanto, Blauch & Grundhofer (1998) propuseram que a deposição do Si nos sítios de infecção de *Erysiphe cichoracearum* em *Arabidopsis* foi devido às altas taxas de transpiração que ocorriam nesses locais devido ao dano da cutícula ao contrário de um transporte ativo.

Além da alta deposição de Si no sítio de infecção do patógeno, observou-se também por meio de MEV que nas folhas das plantas supridas com Si os acérvulos foram menores e em número reduzido do que nas folhas das plantas não supridas com Si. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados anteriormente por Resende et al. (2009) de que a aplicação de silicato de cálcio no solo aumentou o período de incubação e o período latente da antracnose nas folhas de sorgo da linhagem BR009 em, respectivamente, 13 e 24% em relação às plantas não supridas com Si. Por outro lado, a eficiência relativa de infecção, determinada como sendo o número de acérvulos por cm² de área foliar, e a área abaixo da curva de progresso da antracnose foram, respectivamente, 75 e 31% menores do que nas plantas não supridas com Si, mostrando a importância do Si em aumentar a resistência do sorgo à antracnose.

Acredita-se que essas áreas de deposição de Si na folha causam um atraso no ingresso e na colonização do fungo permitindo, assim, que a planta tenha mais tempo para ativar as repostas de defesa. Portanto, o mecanismo de defesa exercido pelo Si é mais complexo do que uma simples barreira física visando prevenir ou atrasar o desenvolvimento do patógeno e os resultados encontrados neste trabalho suportam essa hipótese já que a atividade das enzimas POX e PPO foram maiores nas folhas das plantas supridas com Si. Resultados semelhantes foram encontrados na interação arroz-*M. grisea* em que observou um aumento na expressão dos genes POX nas plantas supridas com Si (Rodrigues et al., 2005). Além disso, aumento nas atividades das enzimas POX e PPO nas plantas supridas com Si também foi observado para outros patossistemas (Chérif et al., 1994;

Dallagnol et al., 2010). As POX têm várias funções fisiológicas que podem contribuir para a resistência da planta como a biossíntese de compostos fenólicos (Schmid & Feucht, 1980), ligações com polissacarídeos (Fry, 1986), lignificação (Walter, 1992) e inibição do crescimento fúngico (Macko et al., 1968). A PPO exerce um papel importante na defesa das plantas, pois oxida compostos fenólicos em quinonas, as quais são tóxicas aos patógenos. As quinonas também podem se ligar a proteínas e carboidratos produzindo compostos que atuam com barreira física aos patógenos (Luthra et al., 1988; Abdel-Aal et al., 2001). No entanto, no presente estudo a atividade da POX não esteve associada com a concentração de lignina nas folhas em concordância com o que foi encontrado para o patossistema arroz-*Bipolaris oryzae* (Dallagnol et al., 2010). Esses resultados indicam que, provavelmente, o papel exercido pela POX na resistência do sorgo à *C. sublineolum* esteja relacionado à sua atividade antioxidante em vez do fortalecimento da parede celular. Outra hipótese que também deve ser considerada é de que essa enzima esteja relacionada com a produção de antocianinas devido a sua participação em algumas etapas da biossíntese dos fenilpropanóides.

Os compostos fenólicos estão associados com as defesas passivas e ativas das plantas aos patógenos e são encontrados tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). A concentração de CFST encontrada no presente estudo não explica a resistência do sorgo à antracnose potencializada pelo Si. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2005) para o patossistema arroz-*M. grisea*. Por outro lado, acredita-se que a contribuição de um grupo específico de fenóis seja importante na resistência potencializada pelo Si como relatado por Bélanger et al. (2003), os quais encontraram deposição de compostos fenólicos na epiderme das folhas de trigo e também na membrana do haustório de *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* nas folhas das plantas supridas com Si. Além disso, os compostos fenólicos pertencentes à via dos fenilpropanóides são precursores de muitas fitoalexinas, as quais aumentam em concentração nas folhas das plantas supridas com Si (Rodrigues et al., 2004; Fawe et al., 1998).

QUI e GLU são enzimas líticas que participam da defesa das plantas aos patógenos por meio da ação hidrolítica da quitina e β -1,3-glucana presentes nas

suas paredes celulares resultando na liberação de fragmentos de quitina e glucana que podem atuar como eliciadores de mecanismos de defesa das plantas (Stintzi et al., 1993). No entanto, apesar da atividade dessas enzimas estar associada com a defesa das plantas, a resistência exercida pelo Si no sorgo parece não estar envolvida com a atividade dessas enzimas, pois foi observada uma maior atividade dessas enzimas nas plantas não supridas com Si. Estes resultados corroboram com os encontrados por Rodrigues et al. (2005), os quais demonstraram que na interação compatível arroz-*M. grisea* houve maior expressão dos genes da quitinase e glucanase nas plantas não supridas com Si. Rodrigues et al. (2003) relataram que os padrões de localização da quitina nas paredes celulares de *M. grisea* presentes nos tecidos de folhas de plantas supridas ou não com Si foram similares quanto à uniformidade e densidade. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, acredita-se que a maior atividade dessas enzimas nas plantas não supridas com Si deve-se ao maior número de sítios de penetração do patógeno e a colonização impedida nas células do tecido foliar.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que além do Si atuar como uma barreira física, esse elemento também está envolvido, de certa forma, em atividades metabólicas, especialmente em plantas submetidas a condições de estresse.

Referências

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Sosulski F. W., Graf, R., Gillott, C., and Pietrzak L. 2001. Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:3559-3566.
- Ali, M. E. K., and Warren, H. L. 1987. Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. *Plant Disease*. 71:402-404.
- Barber, M. S., and Ride, J. P. 1988. A quantitative assay for induce lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 32:185-197.
- Bélanger, R. R., Benhamou, N., and Menzies, J. G. 2003. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology*. 93:402-412.

- Blaich, R., and Grundhofer, H. 1998. Silicate incrusts induced by powdery mildew in cell walls of different plant species. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 105:114-120.
- Bradford, M. M. 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.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R., and Lamb, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*. 6:1703-1712.
- Bruce, R. J., and West, C. A. 1988. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragment in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*. 91:889-897.
- Cardwell, K. F., Hepperly, P. R., and Frederiksen, R. A. 1989. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease*. 73:255-257.
- Carver, T. L. W., Robbins, M. P., Thomas, B. J., Troth, K., Raistrick, N., and Zeyen, R. J. 1998. Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52:245-257.
- Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Robbins, M. P., and Zeyen, R. J. 1998. Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52:223-243.
- Chance, B., and Maehley, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2:764-775.
- Chérif, M., Asselim, A., and Bélanger, R. R. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*. 84:236-242.
- Datnoff, L. E., Rodrigues, F. Á., and Seebold, K. W. 2007. Silicon and Plant Disease. Pages 233-246 in: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. L. E. Datnoff, W. H. Elmer, and D. M. Huber, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Dixon, R. A., and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7:1085-1097.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:641-664.

Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*, 2nd edn. John Wiley and Sons, New York, NY.

Flott, B. E., Moerschbacher, B. M., and Reisener, H. 1989. Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist*. 111:413-421.

Frederiksen, R. A. 1984. Anthracnose stalk rot. In: *Sorghum Root and Stalk Rots, a Critical Review*. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases.

Fry, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review Plant Physiology*. 37:165-186.

Goy, P.A., Felix, G., Metraux, J. P., and Meins, F. Jr. 1992. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa*_*Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiology and Molecular Plant Pathology*. 4:11-21.

Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Pietro, A. D., Peterbauer, C., and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*. 83:313-18.

Ishiguro, K. 2001. Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. Pages 277-291 in: *Silicon in Agriculture*. L. E. Datnoff, G. H. Snyder, and G. H. Korndörfer, eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 57:315-319.

Kombrink, E. M., and Schroder, K. Hahlbrock. 1988. Several 'pathogenesis-related' proteins in potato are β -1,3-glucanases and chitinases. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* 85:782-786.

Luthra, Y. P., Ghandi, S. K., Joshi, U. N., and Arora, S. K. 1988. Total phenolic compounds and their oxidative enzymes in sorghum leaves resistant and susceptible to *Ramulispora sorghicola* Harris. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 23:393-400.

Macko, V., Woodbury, W., and Stahmann. M. A. 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth on mycelium of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Phytopathology*. 58: 1250-1254.

Nicholson R. L., Jamil, F. F., Snyder, B. A., Lue, W. L., and Hipskind J. 1988. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 33:271-278

- Nicholson R. L., Kollipara, S. S., Vincent, J. R., Lyons, P.C., and Cadena-Gomez G. 1987. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* 84:5520-5524
- Nicholson, R. L., and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compound and their role in disease resistance. *Annual Review Phytopathology.* 30:369–389
- Pande, S., Mughogho, L. K., Badhiopadhyay, R., and Karunakar, R. I. 1991. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease.* 75:778-783.
- Perumalla, C. J., and Heath, M. C. 1991. The effect of inhibitors of various cellular processes on the wall modifications induced in bean leaves by the cowpea rust fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 38:293–300.
- Ray, H., and Hammerschmidt, R. 1998. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 53:81-92.
- Reimers, P. J., Guo, A., and Leach, J. E. 1992. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology.* 99:1044-1050.
- Resende, R. R., Rodrigues, F. A., Soares, J. M., and Casela, C. R. 2009. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal of Plant Pathology* 124:533-541.
- Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology.* 134:169-76.
- Rodrigues, F. A., Jurick, W. M., Datnoff L. E., Jones J. B., Rollins J. A. 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 66:144-159.
- Rodrigues, F. A., McNally, D. J., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology.* 94:177-183.
- Rodrigues, F.A., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J. B., and Bélanger, R. R. 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology.* 93:535-546.
- Samuels, A. L., Glass, A .D. M., Menzies, J. G., and Ehret, D. L. 1994. Silicon in cell walls and papillae of *Cucumis sativus* during infection by *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 44:237-242.

- Samuels, A. L., Glass, A. D. M., Eheret, D. L., and Menzies, J. G. 1991. Distribution of silicon in cucumbr leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). Canadian Journal of Botanic. 69:140-146.
- Sangster A.G., and Parry, D. W. 1976. Endodermal silicification in mature, nodal roots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Annals of Botany. 40:373-379.
- Sasaki, T., and Antonio B. A. 2009. Sorghum in sequence. Nature. 457:547-548.
- Schmid, P. S., and Feucht, W. 1980. Tissue-specific oxidative browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. Gartenbauwissenschaft. 45:68-73.
- Sharma, H. C. 1978. Screening of sorghum for leaf-disease resistance in India. Pages 249-264 in: Sorghum Diseases: A World Review. Proceedings of the International Workshop on Sorghum Diseases. International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropic. Patancheru, India.
- Stein, B. D., Klomparens, K. L., and Hammerschmidt, R. 1993. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. Journal Phytopathology. 137:177-188.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedermannmerdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie.75:687-706.
- Van Loon, L. C. W. S., Pierpoint, T., and Boller, V. Conejero, 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology Reporter. 12:245-264.
- Walter, M. H. 1992. Regulation of lignification in defense. Pages 327-352 in: Genes Involved in Plant Defense. T. Boller and F. Meins, eds. Springer-Verlag, New York.
- Yoshida, S. 1965. Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. Bulletin of the National Institute of Agricultural Science Series. 15:1-58.
- 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.

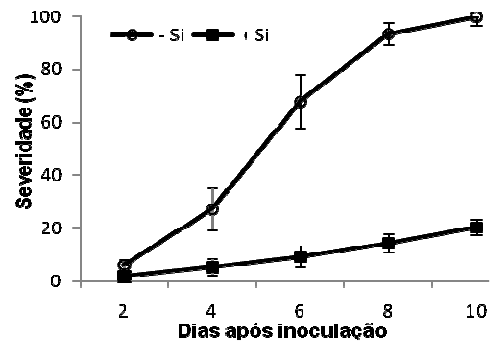


Figura 1. Progresso da antracnose nas folhas de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva sem (-Si) ou com (+Si) a presença de silício. As barras representam o desvio padrão da média ($n = 6$).

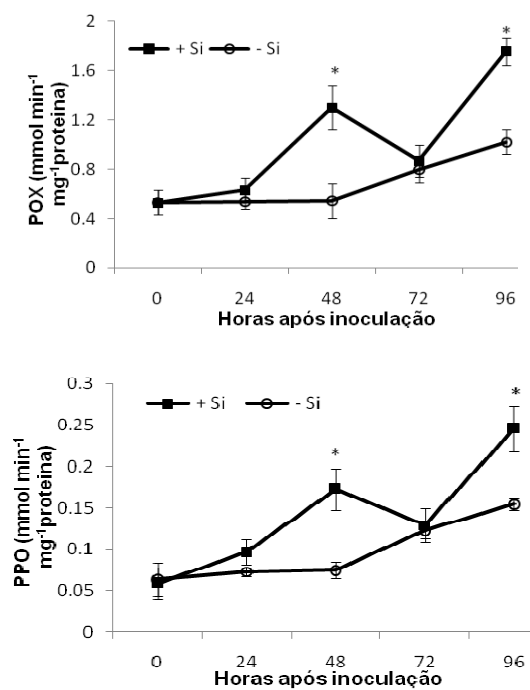


Figura 2. Atividade da peroxidase (POX) e da polifenoloxidase (PPO) nas folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva sem (-Si) ou com (+Si) a presença de silício e inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. As barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste de *t*.

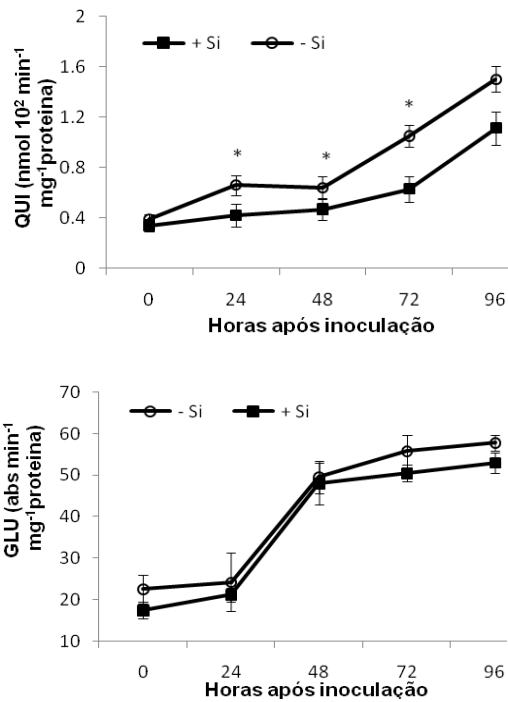


Figura 3. Atividade da quitinase (QUI) e da β -1,3-glucanase (GLU) nas folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva sem (-Si) ou com (+Si) a presença de silício e inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. As barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste de *t*.

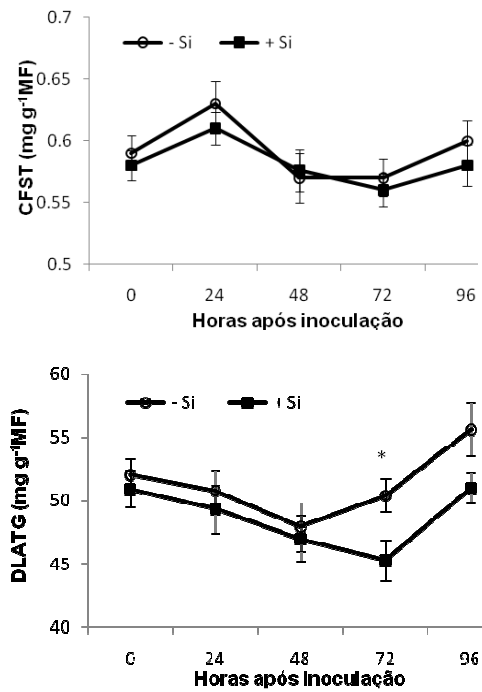


Figura 4. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) nas folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva sem (-Si) ou com (+Si) a presença de silício e inoculadas ou não com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. As barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste de *t*. M.F. = matéria fresca.

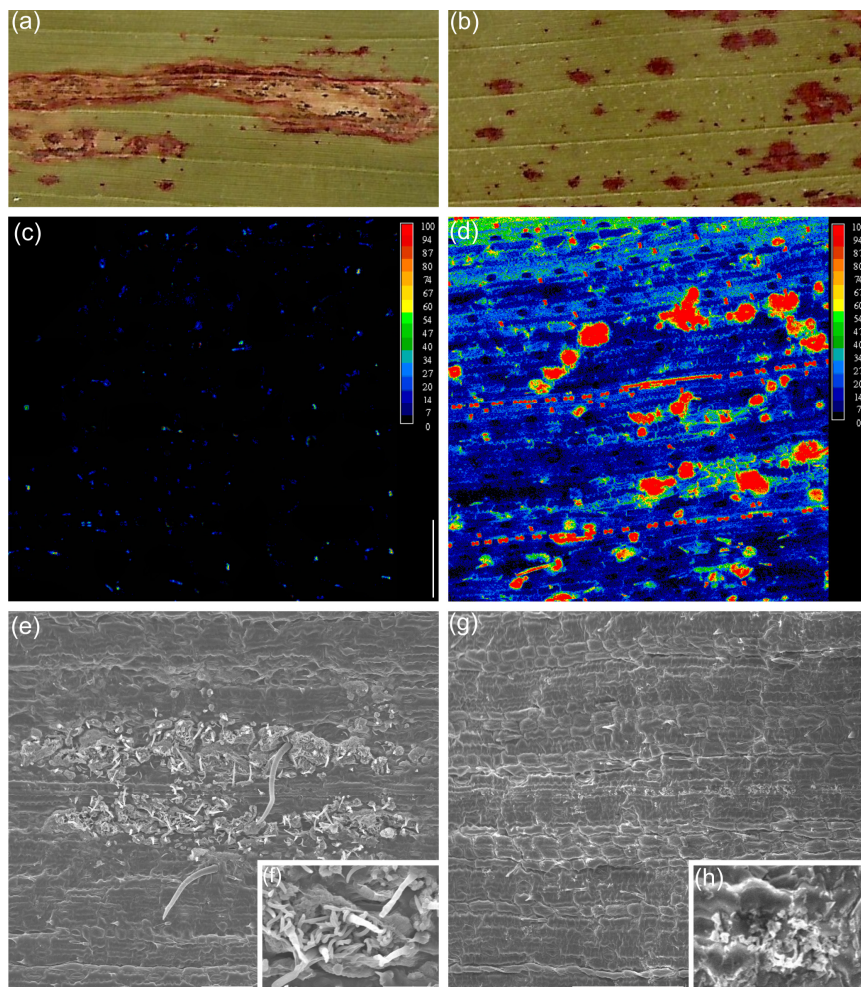


Figura 5. Sintomas da antracnose (a,b), microanálises de raios-X mostrando a deposição de silício (Si) (c,d) e eletromicrografias de varredura de acérvulos (e,f,g,h) em folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva sem (-Si) (a,c,e,f) ou com (+Si) (b,d,g,h) a presença de silício. Escala em cor vermelha representa alta deposição de silício e cor preta ausência de silício (c,d). Barras em c, d e g = 200 μm ; e = 100 μm ; f = 30 μm ; h = 20 μm .

CAPÍTULO 2

SILÍCIO INFLUENCIA A FOTOSÍNTESE E O METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE PLANTAS DE SORGO INFECTADAS POR *Colletotrichum sublineolum*

Silício influencia a fotossíntese e o metabolismo antioxidativo de plantas de sorgo infectadas por *Colletotrichum sublineolum*

Resumo

O silício é considerado um elemento benéfico para as plantas, especialmente quando elas são submetidas a condições de estresse. No entanto, os mecanismos modulados pelo Si para amenizar o estresse ainda são desconhecidos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do Si na capacidade fotossintética e no sistema antioxidante de plantas de sorgo infectadas por *Colletotrichum sublineolum*. Os resultados mostraram que parâmetros relacionados com as trocas gasosas como a condutância estomática e a fotossíntese foram maiores nas plantas supridas com Si e infectadas por *C. sublineolum*, enquanto a severidade, a concentração de aldeído malônico e o extravasamento de eletrólitos foi menor em comparação com as plantas não supridas com esse elemento. Além disso, o aumento na atividade da SOD nas folhas das plantas supridas com Si pode ter contribuído para redução nos níveis de O_2^- e, por consequência, na redução da peroxidação de lipídios. Portanto, o Si afetou a fisiologia das plantas de sorgo infectadas por *C. sublineolum* auxiliando-as na manutenção da integridade da membrana plasmática e sem grandes alterações na capacidade fotossintética.

Palavras-chave: silício, antracnose, trocas gasosas, sistema antioxidativo

Introdução

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* (Ces.) Wilson, é considerada a principal doença da cultura do sorgo em todas as regiões produtoras do mundo, as quais incluem a África, a Ásia e as Américas (Pande et al., 1991). A antracnose torna-se economicamente importante em condições de clima quente e úmido, incluindo o trópico semi-árido, o trópico úmido e as regiões de clima temperado com temperaturas elevadas no verão (Pande et al., 1994; Casela et al., 1997). Nas folhas, são formadas lesões elípticas a circulares com margens avermelhadas com numerosos acérvulos. Sob condições de alta umidade, as lesões aumentam em número e ao coalescerem, cobrem a maior parte

da área foliar causando a seca precoce dessas (Casela et al., 1997). Em cultivares suscetíveis e sob condições ambientais favoráveis ao progresso da antracnose, ocorre completa destruição de toda a parte aérea das plantas, reduzindo a produção de grãos e de forragem (Frederiksen et al., 2000).

Quando infectadas por patógenos, as plantas respondem ativando vários mecanismos de defesa, os quais requerem intensos fluxos de carbono que são desviados do metabolismo primário para o metabolismo secundário (Bolton, 2009). Vários estudos têm demonstrado que infecções por patógenos ocasionam modificações no aparato fotossintético e, conseqüentemente, decréscimo na fotossíntese (Bastiaans, 1991; Berger et al., 2007; Chou et al., 2000). Esse decréscimo pode ser devido à retroinibição metabólica da fotossíntese ou um dano direto no aparato fotossintético. Estresses bióticos e ou abióticos resultam em aumento na energia de excitação, o que excede a quantidade requerida no metabolismo fotossintético (Asada, 1999). O excesso da energia de excitação é altamente prejudicial às plantas, levando a destruição dos centros de reação dos fotossistemas e a danos oxidativos (Mateo et al., 2004). Além disso, o aumento na energia de excitação tem sido associado com redução na assimilação do CO₂ causado pelo decréscimo na condutância estomática e também criando condições que ocasionam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mateo et al., 2004).

As EROs são predominantemente representadas pelo superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e pelo oxigênio singlete (¹O₂) (Apel & Hirt, 2004). A produção de derivados do oxigênio aumenta em decorrência dos estresses bióticos e ou abióticos (Apel & Hirt, 2004). Portanto, uma das respostas de defesa das plantas à infecção por um patógeno é a rápida produção e acúmulo de EROs (Mehdy, 1994). Caso não sejam rapidamente eliminados do metabolismo, as EROs podem reagir com os ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática, nas membranas das organelas e endomembranas ocasionando a peroxidação dos lipídeos (Scandalios, 1993). Além disso, as EROs podem danificar os pigmentos fotossintéticos, as proteínas e os ácidos nucléicos (Moller, 2001). Para controlar as concentrações das EROs e diminuir a citotoxicidade, as plantas desenvolveram um sistema antioxidante de

proteção que inclui pequenas moléculas como o ascorbato, a glutathiona, os flavonóides e os carotenóides, além das enzimas antioxidantes (Ron Mittler, 2002). As enzimas antioxidantes mais importantes são as dismutases do superóxido (SOD) que catalizam a dismutação do O_2^- a H_2O_2 ; as catalases (CAT) que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 e as enzimas do ciclo ascorbato-glutathiona como as peroxidases do ascorbato (APXs) que reduzem o H_2O_2 nos plastídeos utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O ascorbato oxidado é então reduzido pela glutathiona reduzida (GSH), a qual é originada da glutathiona oxidada (GSSG), catalizada pela redutase da glutathiona (GR) à expensas da NADPH (Apel & Hirt, 2004).

Embora o silício (Si) não seja reconhecido como um elemento essencial para as plantas, seu efeito benéfico no crescimento, produção e resistência de várias espécies de plantas às doenças e pragas é bem documentado (Datnoff et al., 2007). No entanto, seu papel na biologia das plantas ainda não é bem compreendido e a tentativa de associar esse elemento com as atividades metabólicas ou fisiológicas tem sido, até o momento, inconclusiva. A literatura registra o efeito do Si em plantas submetidas a estresses abióticos envolvendo as EROs. Em condições de excesso de água, a SOD e APX não apresentaram aumento em atividades nas folhas de plantas de trigo supridas com Si enquanto que as atividades da POX e da CAT sofreram decréscimo (Gong et al., 2003). Plantas de pepino sob estresse salino e crescendo na presença de Si, apresentaram aumento nas atividades da SOD, GR e APX, exceto para a CAT (Zhu et al., 2004). As atividades da SOD, POX, CAT e GR em folhas de plantas de cevada supridas com Si e submetidas a estresse salino foram maiores (Liang et al., 2003). No entanto, estudos mais detalhados mostrando o efeito do Si na fisiologia das plantas sob estresse biótico ainda necessitam ser melhor investigados. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito do Si nas trocas gasosas e no sistema anti-oxidativo de plantas de sorgo infectadas por *C. sublineolum*.

Material e Métodos

Preparo da solução nutritiva: a solução nutritiva foi preparada segundo Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações: 3 mM KNO_3 ; 0,5 mM

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mM $\text{Ca}_2(\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,30 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,33 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 11,5 μM H_3BO_3 ; 3,5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 50 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 50 μM EDTA. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2002), foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mMol Si/L (+Si).

Crescimento das plantas de sorgo: sementes da linhagem de sorgo CMSXS142 [BR 009 (Tx623) - Texas], suscetível à antracnose (Resende et al., 2009), foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por dois minutos, seguidas de lavagem em água destilada por três minutos e germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidos a 25 °C por seis dias. As sementes germinadas foram transferidas para vasos plásticos contendo cinco litros de solução nutritiva 1/2 força iônica da solução anteriormente citada, sem adição de Si. Após sete dias, a concentração da solução nutritiva foi modificada para força total, adicionando-se ou não ácido monossilícico. Cinco plantas foram mantidas em cada vaso. A solução nutritiva foi aerada e trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

Obtenção do inóculo de *C. sublineolum* e inoculação das plantas: as plantas de sorgo foram inoculadas com um isolado monospórico de *C. sublineolum* (CNPMS-12) fornecido pelo Laboratório de Resistência às Doenças da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. O isolado de *C. sublineolum*, armazenado em tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar coberto com óleo mineral, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (aveia 60 g/L e ágar 17 g/L). Após a repicagem do fungo, as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C onde permaneceram por até 10 dias até ocorrer abundante crescimento micelial. Em seguida, foi feita raspagem superficial do micélio e as placas foram transferidas para câmara de crescimento com luz constante e temperatura de 25 °C para a esporulação do fungo. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 mL de água destilada em cada placa fazendo-se raspagem superficial, com espátula, para liberação dos conídios. A suspensão

obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de 1×10^6 conídios/mL pela contagem em hemacitômetro. Tween 20 (0,1 mL/mL de suspensão) foi adicionado à suspensão. Plantas com 30 dias de idade (estágio de crescimento 30) (Fredriksen, 2000) foram inoculadas com *C. sublineolum* e transferidas para câmara de nevoeiro a 25 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$. Após 18 h no escuro, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 26 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$ onde permaneceram até o final das avaliações.

Avaliação da severidade da antracnose: a severidade foi avaliada aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (dai) das plantas utilizando-se a escala diagramática de Sharma (1983). Com os valores obtidos, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) por meio da integração trapezoidal (Shaner and Finney, 1977).

Avaliação das trocas gasosas: a taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), a razão entre a taxa de assimilação líquida de carbono e a taxa de transpiração (E) foram determinadas em duas folhas de cada planta da repetição de cada tratamento das 8:00 até às 12:00 h, em sistema aberto, sob luz e concentração de CO_2 ambientes, utilizando-se um analisador de gás infravermelho (LC *pro*⁺, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). A temperatura média durante as avaliações foi de 35 °C.

Determinação do extravasamento de eletrólitos (EE): a concentração de eletrólitos extravasados foi determinada conforme metodologia descrita por Lima et al. (2002) com algumas modificações. Amostras de folhas de 10 cm² (21 discos) foram lavadas por duas vezes em água deionizada imediatamente após a remoção das folhas. Em seguida, os discos foram colocados em 60 mL de água deionizada a 25 °C por quatro horas. O EE foi estimado usando um condutivímetro (Tecnonon mCA-150, MS Tecnonon 21 Instrumentação Científica). Os resultados foram expressos como porcentagem total de condutividade, a qual foi obtida após incubação das amostras a 90°C, por duas horas.

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de aldeído malônico (MDA): a concentração de H_2O_2 foi determinado segundo

metodologia proposta por Lee & Lee (2000). Os danos celulares que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram avaliados quantificando a peroxidação de lipídios através da produção de MDA segundo Cakmak & Horst (1991).

Determinação das atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo: para a determinação das atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalases (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7), 200 mg de amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram trituradas em almofariz gelado contendo 60 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 1 ml de meio de extração específico para cada enzima. Para a SOD, foi usado 100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,8), 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,1% Triton X-100; para a CAT 100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) e 0,1 mM EDTA e para a APX 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) e 1 mM ascorbato. A mistura resultante foi centrifugada por 15 min a $15000 \times g$ a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinar a concentração de proteínas (Bradford, 1976) e para as determinações enzimáticas. Para extração da GR, utilizou-se o tampão de extração composto de 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA, 10 mM isoascorbato, 9 mM 2-mercaptoetanol e 0,1% v/v Triton X-100. A atividade da SOD foi determinada medindo a capacidade dessa enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977). Cada 3 ml do extrato de reação foi constituído de 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,8), 14 mM metionina, 75 μ M NBT, 0,1 μ M EDTA, 5 μ l do extrato enzimático e 2 μ M riboflavina. A produção do azul de formazana, resultante da foto-redução do NBT, foi monitorada pelo incremento na absorbância a 560 nm (Martinez et al., 2001). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT. A atividade da CAT foi estimada pela taxa de decomposição do H_2O_2 a 240 nm (Havir & McHale, 1987). Cada 3 ml do extrato de reação foi composto por 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 12,5 mM de H_2O_2 e 20 μ l do extrato enzimático. Uma unidade da CAT foi definida como a quantidade de enzima requerida para decompor 1 μ M de H_2O_2 min^{-1} . A atividade da APX foi

determinada monitorando o decréscimo na absorbância a 290 nm (Nakano & Asada, 1981). Cada 3 ml do extrato de reação foi composto por 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1 mM de H₂O₂ e 20 µl do extrato enzimático. Uma unidade da APX foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 µM de ascorbato min⁻¹. A atividade da GR foi avaliada por meio da taxa de oxidação da NADPH e NADH a 340 nm. O extrato de reação foi composto por 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM GSH, 3 mM MgCl₂ e 0,15 mM NADPH.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados: os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com dez e seis repetições, respectivamente, para o experimento referente a determinação das trocas gasosas e obtenção das amostras para as análises enzimáticas. Cada unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo cinco plantas. As médias dos tratamentos -Si e +Si para cada variável foram comparadas pelo teste-*t* (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Resultados

Severidade da antracnose e AACPD: a severidade da antracnose nas folhas das plantas não supridas com Si aumentou do 2º até ao 10º dai quando atingiu 90% (Fig. 1 A). Nas folhas das plantas supridas com Si, o progresso da antracnose foi mais lento durante o período de avaliação, com severidade de 15% aos 10 dai (Fig. 1 A). A AACPD nas plantas supridas com Si foi reduzida em 86% em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 1 B).

Trocas gasosas: nas avaliações realizadas tanto às 8 h quanto às 12 h, os valores médios de *A*, *g_s* e *E* foram maiores para as plantas inoculadas com *C. sublineolum* e supridas com Si do que os obtidos para as plantas inoculadas e não supridas com Si aos 4 e aos 8 dai (Figs. 2). Esses aumentos aos 4 e 8 dai foram, respectivamente, de 44 e 147% para *A*; 51 e 153% para *g_s* e 36 e 133% para *E*. Para as plantas não inoculadas, não houve diferença significativa entre tratamentos -Si e +Si para nenhuma dessas variáveis. Não houve diferença significativa para a razão *C_i/C_a* entre os tratamentos -Si e +Si independente se as plantas foram inoculadas ou não com *C. sublineolum*. Houve correlação negativa

e significativa entre a severidade e g_s para as plantas supridas com Si (Tabela 1). Além disso, os maiores valores de g_s para as plantas supridas com Si resultaram em maiores valores de E (Fig. 2), verificado também pela correlação positiva entre g_s e E (Tabela 1). Houve correlação negativa e significativa entre a severidade e A e correlação positiva e significativa entre g_s e A (Tabela 1).

Determinação do EE, de H_2O_2 e MDA: o EE aumentou significativamente nas plantas não supridas com Si aos 4 e 8 dai, ou seja, um acréscimo, respectivamente, de 47 e 26% em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 3). Aos 8 dai, a concentração de H_2O_2 foi significativamente maior nas plantas não supridas com Si em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 3). Houve aumento significativo de 31 e 38% na concentração de MDA aos 4 e 8 dai, respectivamente, para o tratamento -Si em relação ao tratamento +Si (Fig. 3).

Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo: houve aumento significativo na atividade da CAT nas folhas das plantas supridas com Si aos 4 e 8 dai (Fig. 4), de 138 e 101%, respectivamente, em relação às plantas supridas com Si. Aos 8 dai, atividade da GR aumentou significativamente nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4). As atividades da SOD e da APX apresentaram aumentos significativos de 99 e 33%, respectivamente, aos 4 dai para as plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4).

Discussão

Apesar do potencial do Si em reduzir os sintomas da antracnose do sorgo já ter sido relatado anteriormente (Resende et al., 2009), os mecanismos pelo qual esse elemento interfere na fisiologia do sorgo permanece ainda desconhecido. Decréscimos na fotossíntese causados por patógenos têm sido bem documentados para várias espécies de plantas (Scholes & Rolfe, 1996; Chou et al., 2000; Berger et al., 2007). No presente trabalho, os parâmetros das trocas gasosas A , g_s e E mostraram-se menores durante o processo infeccioso de *C. sublineolum* nas plantas não supridas com Si, valendo ressaltar também que essas plantas apresentaram maior severidade da antracnose e, conseqüentemente, maior AACPD em comparação às plantas supridas com Si. Este resultado é corroborado

pela correlação negativa entre a severidade e os parâmetros A , g_s e E . Além disso, a correlação positiva entre C_i/C_a e g_s é um indicativo de que os menores valores de A obtidos para essas plantas foi devido a uma limitação estomática e não bioquímica. A redução em A nas plantas não supridas com Si pode ser explicada pelos menores valores de g_s , o que por sua vez ocasionou menor influxo de CO_2 e, ao mesmo tempo, levou a menores perdas de vapor d'água via transpiração em relação às plantas supridas com Si. Um dos sintomas típicos da antracnose do sorgo é a seca das folhas, assim, para evitar a perda de água, as plantas doentes fecham seus estômatos mantendo um status hídrico favorável, porém limitando também o suprimento de CO_2 a nível dos cloroplastos. Alguns autores sugerem que os mecanismos relacionados ao processo infeccioso de patógenos foliares podem ter um significativo efeito no fechamento estomático como, por exemplo, a senescência acelerada causada pelas mudanças hormonais principalmente relacionado com o aumento na produção de etileno (Tzeng e DeVay, 1985; Aguirreolea et al., 1995) e um possível envolvimento de toxinas não específicas produzidas pelos patógenos (Hampton et al., 1990) são alguns dos mecanismos propostos.

Decréscimos na transpiração são geralmente observados em tecidos foliares infectados por patógenos que causam fechamento estomatal ou que obstruem os espaços intercelulares e esporulam pelos estômatos (Duniway e Durbin 1971; Spotts e Ferree 1979). A taxa de transpiração nas plantas não supridas com Si apresentou decréscimos proporcionais com o progresso da severidade. Além da redução em g_s observada nessas plantas, a redução da transpiração pode ter sido resultante da colonização dos espaços do mesófilo pelas hifas de *C. sublineolum*, a murcha precoce ou a seca definitiva das folhas doentes. Resultados similares foram obtidos por Bassanezi (2000, 2002), o qual observou decréscimo na transpiração das folhas de feijão com sintomas da antracnose devido ao fechamento estomático. Esse autor ainda observou que as reduções em g_s foram responsáveis por menores valores de C_i e tornou-se o fator limitante na capacidade de assimilação do CO_2 nas folhas doentes.

Embora não tenham sido observados sintomas severos da antracnose dos 4 aos 6 dias, ocorreu expressiva redução em A . Isso indica um efeito negativo do

progresso infeccioso de *C. sublineolum* na fisiologia do sorgo, mesmo sob condição de menor severidade da antracnose. Sabe-se que *C. sublineolum* é capaz de secretar enzimas líticas e toxinas não específicas que difundem para os tecidos da folha ainda não colonizados, além de absorver carboidratos e nutrientes dos tecidos sadios podem afetar fotossíntese. Dessa forma, a área foliar afetada pelo patógeno é bem maior que a área realmente colonizada. Similarmente, Meyer et al. (2001) relataram que *Colletotrichum lindemuthianum* induziu o fechamento estomático em áreas verdes de folhas de feijão, aparentemente sadias, reduzindo a fotossíntese de toda a folha mesmo quando a doença encontrava-se sob baixa severidade.

Nas plantas não inoculadas com *C. sublineolum*, independente da presença do Si, não houve alterações nos parâmetros fotossintéticos avaliados. Fauteux et al. (2006) também demonstraram, por meio de análise de microarranjos, que a expressão de genes relacionados com o metabolismo primário de plantas de *Arabidopsis* não inoculadas com *Erysiphe cichoracearum* e supridas com Si não foi alterada. Contrariamente, na presença do Si, houve aumento na expressão de genes relacionados com a fotossíntese e algumas rotas energéticas em plantas de *Arabidopsis* infectadas por *E. cichoracearum* (Fauteux et al., 2006).

As maiores concentrações de MDA encontradas durante a peroxidação de lipídeos indicam danos celulares que resultam no aumento da fluidez da membrana, aumentando, assim, o EE. Von Gonner & Schlosser (1993) mostraram que no início da colonização do tecido foliar de aveia pelos patógenos necrotróficos *Drechslera avenae* e *Drechslera siccans*, houve aumento na peroxidação de lipídeos já que patógenos com esse tipo de nutrição utilizam espécies reativas de oxigênio para destruir as células causando intensa necrose. No presente trabalho, a menor severidade da antracnose em plantas de sorgo supridas com Si foi o resultado de uma menor colonização dos tecidos foliares por *C. sublineolum* em associação com menores concentrações de MDA e EE. Assim, na presença de Si, ocorreu uma diminuição na permeabilidade da membrana plasmática e na peroxidação de lipídeos. O Si tem um importante papel na integridade da membrana plasmática de plantas expostas a diferentes tipos de estresses abióticos, principalmente o salino. De acordo com Liang et al. (2003,

2006), as menores concentrações de MDA e de EE ocorreram nas plantas supridas com Si e submetidas à altos níveis de sódio, bem como maior atividade da H⁺-ATPase na membrana plasmática e uma maior estabilidade dos lipídios.

Além da limitação estomática, danos nos fotossistemas devido à infecção por *C. sublineolum*, pode ter também contribuído para os menores valores de A na ausência do Si. Nas folhas das plantas infectadas por diferentes patógenos, observa-se, geralmente, redução no transporte de elétrons da cadeia fotossintética, indicando decréscimo na eficiência do uso da luz e, conseqüentemente, aumento no excesso de energia de excitação (Bechtold et al., 2005). Essa energia de excitação, em excesso, pode estar associada com o decréscimo em g_s proporcionando, assim, condições para aumentar a produção de EROs que prejudicam a homeostase celular (Mateo et al., 2004). Desta forma, o sistema enzimático anti-oxidativo exerce um papel detrimental na proteção celular quando a capacidade de dissipação do excesso de energia de excitação torna-se saturada. No presente estudo, a maior concentração de H₂O₂ nas folhas das plantas não supridas com Si foi, provavelmente, originada pelo sucesso do processo infeccioso de *C. sublineolum* nos tecidos foliares e pelo deficiente sistema anti-oxidante observado nessas plantas. Estudos anteriores mostraram que altas concentrações de H₂O₂ ocorreram em plantas suscetíveis à patógenos hemibiotróficos, principalmente durante a fase necrotrófica (Basavaraju et. al., 2009; Shetty et. al, 2007). Além disso, alguns patógenos necrotróficos podem estimular a produção de EROs nos tecidos infectados para promover a morte celular e garantir a disponibilidade de nutrientes que garantirão a máxima colonização e uma grande produção de inóculo (Govrin & Levine, 2000).

A concentração de H₂O₂ pode ser reduzida através de sua remoção enzimática pela CAT e APX ou por complexar o Fe(III) ou o Fe(II) com taninos ou proantocianidinas prevenindo a geração de OH (Toda, 2005; Andrade et al., 2006). É interessante notar que 3-deoxiantocianidinas, uma fitoalexina da classe dos flavonóides, é sintetizada em grandes quantidades nas folhas de plantas de sorgo durante as respostas de defesa contra a infecção por patógenos (Lo et al., 1999). Dessa forma, além da menor concentração de H₂O₂ nas folhas das plantas supridas com Si em função da maior atividade da CAT e APX, acredita-se,

também, que com aumento da resistência das plantas de sorgo supridas com Si à antracnose, a produção de H₂O₂ pode ter sido convertida para a produção de antocianidina.

O aumento na atividade da SOD nas folhas das plantas supridas com Si contribuiu para reduzir os níveis de O₂⁻ e, por consequência, diminuir a peroxidação dos lipídios na membrana plasmática, protegendo o tecido foliar contra o estresse oxidativo. Scandalios (1993) mostrou que o O₂⁻ e seus derivados são altamente citotóxicos e podem reagir com os ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática causando a peroxidação desses. A redução na concentração de H₂O₂, um sub-produto da SOD, pode ter tido a participação da APX e da CAT, as quais também apresentaram maiores atividades nas folhas das plantas supridas com Si.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o Si interferiu na fisiologia das plantas de sorgo especialmente quando infectadas por *C. sublineolum*, diminuindo os danos causados a nível da membrana plasmática e também da fotossíntese. Além disso, é plausível que a resistência do sorgo à antracnose esteja sendo potencializada pelo Si devido a um sistema enzimático antioxidante mais eficiente. Contudo, não se deve descartar a possibilidade de que outros mecanismos também possam estar atuando na proteção do aparato fotossintético nas folhas de plantas supridas com Si quando infectadas por *C. sublineolum*.

Referências

- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639.
- Bastiaans, L. 1991. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* 81:611-615.
- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58:4019-4026.

Bolton, M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:487-97.

Chain, F., Côté-Beaulieu, C., Belzile, F., Menzies, G., Bélanger, R. R. 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.

Chou, H., Bundock, N., Rolfe, S. A., Scholes, J. D. 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* 1:99-113.

Datnoff, L. E., Rodrigues, F. A., Seebold, K. W. 2007. Silicon and Plant Disease. In: Datnoff, L. E., Elmer, W. H. & Huber, D. M. (Eds.) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. The American Phytopathological Society. p.233-246.

Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J. G., Bélanger, R. R. 2006. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Proc.* 103:17554-17559.

Gong, H., Chen, K., Chen, G., Wang, S., Zhang, C. 2003. Effects of silicon on the growth of wheat and its antioxidative enzymatic system. *Chinese Journal of Soil Science* 34:55-57.

Liang, Y. C. 1999. Effects of silicon on enzyme activity, and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant Soil* 209:217-224.

Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H., Ding, R. X. 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology* 160:1157-1164.

Liang, Y. C., Shen, Q. R., Shen, Z. G., Ma, T. S. 1996. Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 19:173-183.

Liang, Y. C., Zhang, W. H., Chen, Q., Liu, Y. L., Ding, R. X. 2006. Effect of exogenous silicon (Si) on H⁺-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany* 57:212-219.

Ma, J. F. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition* 50:11-18.

Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C. C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J. E., Mullineaux, P. M., Karpinski, S. 2004. LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology* 136:2818-2830.

Moller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:561-91.

Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101:7-12.

Scholes, J. & Rolfe, S. A. 1996. Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199:573-582.

Zhu, Z. J., Wei, G. Q., Li, J., Qian, Q. Q., Yu, J. Q. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167:527-533.

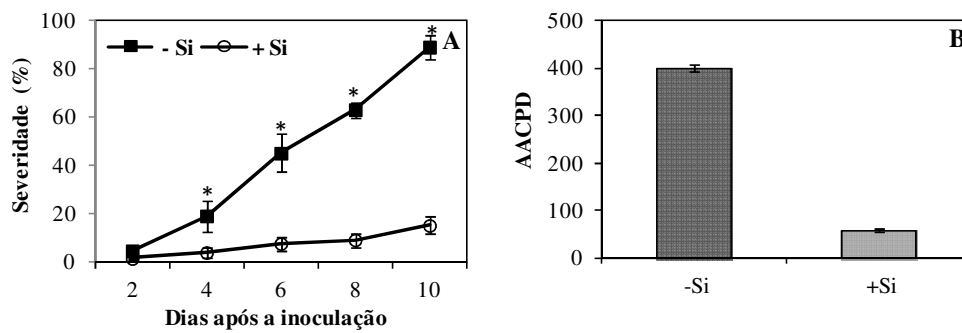


Figura 1. Progresso da severidade da antracnose (A) e área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) (B) nas folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si). Para o progresso da antracnose, médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada avaliação são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste-*t*. Barras representam o desvio padrão da média.

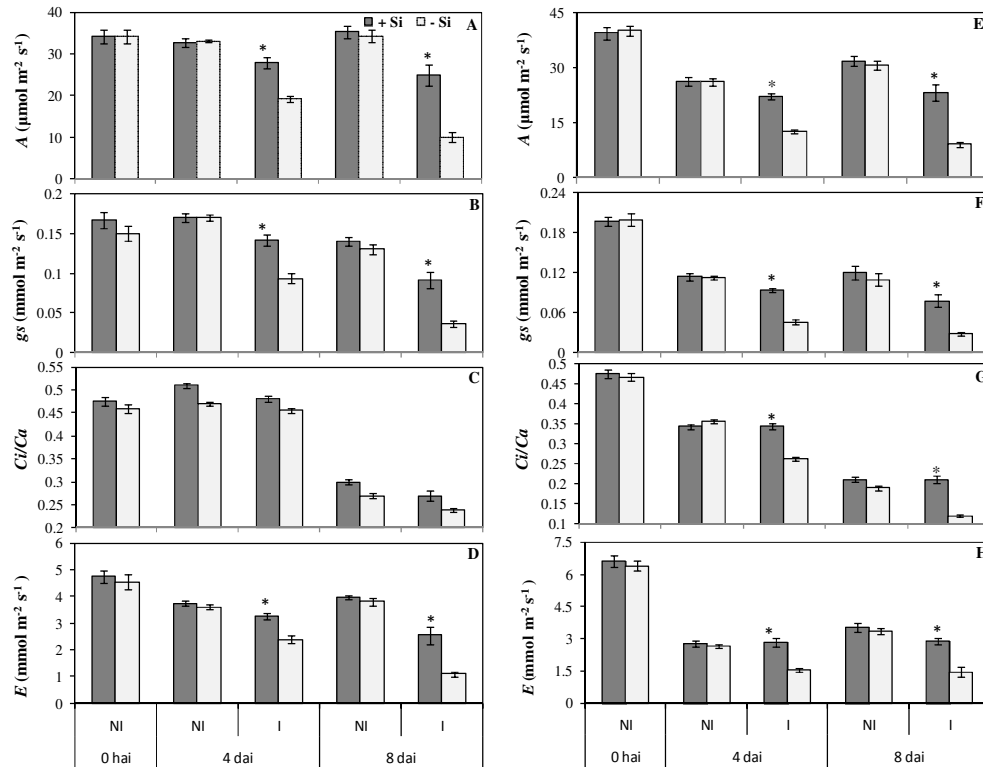


Figura 2. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) e transpiração (E) determinadas às 8 h (A, B, C e D) e às 12 h (E, F, G e H) nas folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si) e inoculadas ou não com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste- t .

Tabela 1. Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), transpiração (E) e severidade (Sev) em plantas de sorgo supridas ou não com silício.

Variáveis	g_s	A	C_i/C_a	E	Sev
g_s	-	0.88	0.74	0.88	-0.60
A	0*	-	0.41	0.87	-0.41
C_i/C_a	0*	0*	-	0.57	-0.77
E	0*	0*	0*	-	-0.55
Sev	0*	0*	0*	0*	-

* significativ a 1% de probabilidade pelo teste- t .

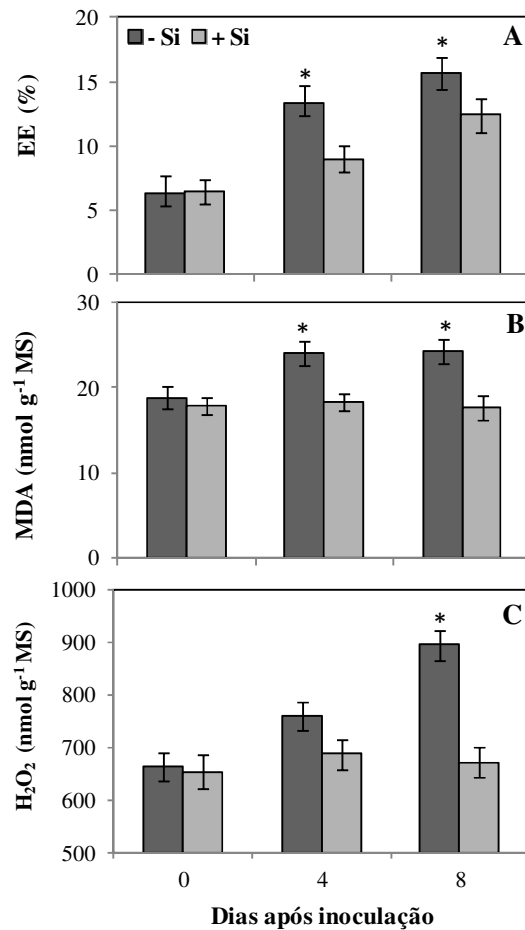


Figura 3. Extravasamento de eletrólitos (EE), concentração de aldeído malônico (MDA) e concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si) e inoculadas ou não com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste-*t*. MS = matéria seca.

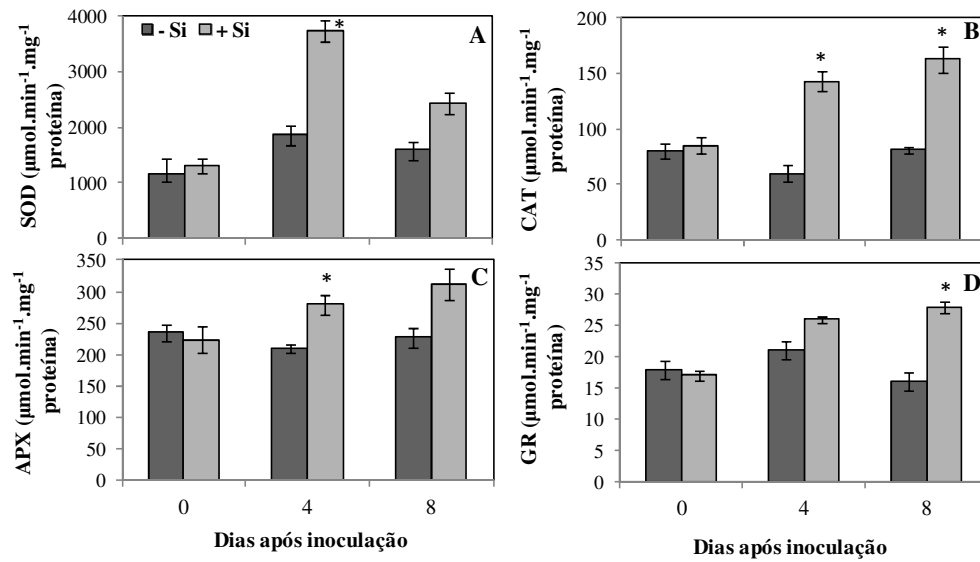


Figura 4. Atividades da dismutase do superóxido (SOD) (A), catalases (CAT) (B), peroxidase do ascorbato (APX) (C) e da redutase da glutathione (GR) (D) em folhas de plantas de sorgo crescidas em solução nutritiva na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si) e inoculadas ou não com *Colletotrichum sublineolum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) pelo teste-*t*.

CAPÍTULO 3

MANEJO DA ANTRACNOSE COM SILÍCIO E FUNGICIDAS EM DUAS LINHAGENS DE SORGO

Manejo da antracnose com silício e fungicida em duas linhagens de sorgo

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da aplicação de Si no solo, em combinação ou não com a aplicação de fungicida, na resistência de duas linhagens de sorgo à antracnose. Para isso, conduziu-se um experimento na safra de verão 2008/2009 utilizando como fonte de Si o silicato de cálcio na dose de 6 t/ha. O calcário foi aplicado na dose de 5 t/h nas parcelas que não receberam silicato de cálcio objetivando equilibrar o nível de cálcio em todos os tratamentos. Na safra 2009/2010, foi estudado o efeito residual do silicato de cálcio e do calcário aplicados na safra 2008/2009. A aplicação de silicato de cálcio no solo na safra 2008/2009 reduziu a área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) em 42 e 39%, respectivamente, nas linhagens BR009 e BR008 enquanto que a pulverização com fungicida reduziu a AACPA em 39 e 50%, respectivamente, nas linhagens BR009 e BR008. Com a aplicação de silicato de cálcio no solo, obteve-se 10 sacas/ha a mais em relação a não aplicação desse produto. Com a aplicação de fungicida, obteve-se 8 sacas/ha a mais do que na ausência desse tratamento. O efeito residual do silicato de cálcio no solo contribuiu para diminuir a severidade da antracnose e aumentar a produtividade do sorgo na safra 2009/2010. Desta forma, o Si pode ser utilizado no manejo da antracnose do sorgo em cultivares suscetíveis e moderadamente resistentes e, conseqüentemente, reduzir o número de aplicações de fungicidas.

Palavras-chave: silicato de cálcio, controle químico, linhagens de sorgo, *Colletotrichum sublineolum*

Introdução

A antracnose do sorgo, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* (Ces.) Wilson, é considerada a principal doença dessa cultura nas regiões produtoras da África, Ásia e Américas (Pande et al., 1991). Essa doença torna-se economicamente importante em áreas com clima quente e úmido localizadas nos trópicos semi-árido e úmido e nas regiões de clima temperado, onde as temperaturas são elevadas no verão (Pande et al., 1994; Casela et al., 1997). No

Brasil, a antracnose está presente em todas as áreas produtoras constituindo-se no principal fator limitante para a implantação da cultura por ocasionar perdas na produção de grãos e de forragem, principalmente em cultivares suscetíveis e em condições ambientais favoráveis para a ocorrência de epidemias severas (Guimarães et al., 1999). Perdas superiores a 50% na produção de grãos têm sido atribuídas à antracnose foliar em condições de epidemias severas, principalmente quando existe alternância de condições de clima seco e úmido em associação com temperaturas elevadas (Casela et al., 1997).

A principal estratégia para o manejo da antracnose é a utilização de cultivares resistentes (Panizzi et al., 2005). No entanto, o controle genético torna-se difícil devido a alta variabilidade das populações de *C. sublineolum* (Ali & Warren 1987; Cardwell, 1989; Pande, 1991). A resistência genética, embora seja a medida de controle mais recomendada aos produtores, não deve ser usada isoladamente, mas como um componente do pacote tecnológico da cultura. Nas principais regiões produtoras de sorgo, principalmente em áreas onde a doença ocorre com alta intensidade, tem sido cada vez mais frequente a utilização do controle químico no manejo dessa enfermidade. No entanto, a aplicação contínua de fungicidas pode, além de selecionar isolados resistentes, causar impactos ao meio ambiente. Nesse contexto, é importante a busca por alternativas de controle que possam ser utilizadas em um programa de manejo integrado da antracnose do sorgo.

A nutrição mineral é uma alternativa cada vez mais empregada para aumentar a resistência das plantas aos patógenos (Walters & Bingham 2007). Entretanto, é necessário conhecer como os nutrientes aumentam e ou diminuem a resistência de uma determinada espécie de planta a um determinado patógeno. Um dos papéis mais importantes do silício (Si) é o aumento da resistência das plantas, especialmente as monocotiledôneas, ao ataque por patógenos (Datnoff et al., 2007). Existem na literatura inúmeros relatos mostrando o potencial do Si em reduzir a intensidade de importantes doenças (Bélanger et al., 1995; Datnoff et al., 1997, 2007; Rodrigues & Datnoff, 2005). Por exemplo, a brusone, a mancha parda, a podridão do colmo, a escaldadura, a queima das bainhas e o escurecimento dos grãos (causada por espécies de *Bipolaris*, *Fusarium*, entre

outros fungos) tiveram suas intensidades significativamente reduzidas após a aplicação de Si no solo (Datnoff et al., 1997; Savant et al., 1997; Rodrigues et al., 2001, 2003; Datnoff & Rodrigues, 2005). Datnoff et al. (1991), aplicaram silicato de cálcio em um solo orgânico deficiente em Si nas doses de 0, 5, 10 e 15 ton/ha e observaram uma redução na severidade da brusone no pescoço e da mancha parda de 31 e 15%, respectivamente, em relação a testemunha. Além disso, o resíduo de silicato no solo contribuiu para diminuir a severidade dessas doenças nos cultivos posteriores. A aplicação de 400 kg ha⁻¹ de Si no solo para o controle da brusone não diferiu significativamente da aplicação do fungicida benomyl (Datnoff & Snyder, 1994). Em outro estudo, a aplicação de 500 kg ha⁻¹ de Si no solo reduziu a severidade da brusone nas folhas e no pescoço em 40 e 72%, respectivamente, em relação à testemunha, a qual não recebeu Si (Seebold, 1998). Sabe-se que o Si aumenta o nível de resistência parcial de cultivares de arroz à brusone para um nível de resistência equiparável ao de cultivares altamente resistentes (Seebold et al., 2000). Seebold et al. (2001) demonstraram para o patossistema arroz-brusone que o número de lesões contendo conídios, o tamanho das lesões, a taxa de expansão das lesões, a severidade e o número de conídios por lesão foram significativamente reduzidos com a adição de doses crescentes de Si no solo. Resende et al. (2009) demonstraram que a aplicação de doses crescentes de silicato de cálcio no solo aumentou o período de incubação e o período latente da antracnose nas folhas de sorgo da linhagem BR009 em, respectivamente, 13 e 24% em relação às plantas não supridas com Si. Por outro lado, a eficiência relativa de infecção, determinada como sendo o número de acérvulos por cm² de área foliar, e a área abaixo da curva de progresso da antracnose foram, respectivamente, 75 e 31% menores do que nas plantas não supridas com Si, mostrando a importância do Si em aumentar a resistência do sorgo à antracnose.

Apesar do uso do Si ser uma importante alternativa para o controle da antracnose do sorgo em solos deficientes nesse elemento, não existem relatos na literatura de trabalhos realizados no campo. Além disso, pouca informação é disponível sobre o uso integrado de diferentes técnicas para o manejo dessa doença no Brasil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da

aplicação de Si no solo, em combinação ou não com a aplicação de fungicida, na resistência de duas linhagens de sorgo à antracnose.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos na área experimental da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, nas safras de verão 2008/2009 e 2009/2010, em uma área com Latossolo Amarelo. O solo apresentou as seguintes características químicas: pH em H₂O = 5,2; P (Mehlich⁻¹) = 3,9 mg/dm³; K (Mehlich⁻¹) = 22 mg/dm³; Al³⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, H+Al³⁺ = 1,0, 1,5, 0,1 e 8,3 cmol_c/dm³, respectivamente; saturação de bases = 1,66% e matéria orgânica = 3,6 dag/kg. A concentração de Si disponível no solo (extração em CaCl₂) foi de 4,2 mg/dm³. A acidez do solo foi corrigida utilizando-se silicato de cálcio (AgroSilício[®], Excell Minerais Ltda, Timóteo/MG) ou calcário dolomítico para elevar a saturação de bases para 50%. O silicato de cálcio (25% de SiO₂ e 31% de CaO), utilizado como fonte de Si, foi incorporado ao solo na dose de 6 t/ha aos 30 dias antes da semeadura. O calcário (38% de CaO e 13% de MgO) foi aplicado na dose de 5 t/ha nas parcelas que não receberam silicato de cálcio objetivando equilibrar o nível de cálcio em todos os tratamentos. Na safra 2009/2010, foi estudado o efeito residual do silicato de cálcio e do calcário aplicados na safra 2008/2010.

Sementes de sorgo das linhagens BR008 e BR009, respectivamente, moderadamente resistente e suscetível à antracnose, foram semeadas nas sub-subparcelas contendo 8 linhas de 10 m espaçadas de 0,8 m e com, aproximadamente, dez plantas por metro linear após o desbaste. A adubação de semeadura para os dois experimentos foi de 500 kg/ha da fórmula 8-28-16 (N-P-K) + Zn. As adubações de cobertura com nitrogênio foram realizadas aos 20 e 30 dias após a emergência das plântulas, utilizando-se 45 kg/ha de uréia. A aplicação do fungicida epoxiconazole + piraclostrobin na dose de 0,6 l/ha foi realizada aos 45 e 60 dias após a semeadura.

A severidade da antracnose foi avaliada em 2 folhas por planta totalizando 24 plantas de cada sub-subparcela após o aparecimento dos primeiros sintomas nas folhas das plantas da linhagem BR009, totalizando seis avaliações. A

severidade foi avaliada utilizando-se a escala diagramática de Sharma (1983) e os valores obtidos foram usados para calcular a área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA) de acordo com Shaner & Finney (1977).

As panículas das plantas utilizadas para avaliar a severidade foram colhidas, embaladas em sacos de papel e colocadas em estufa a 42°C por 24 h. Após a debulha, os grãos foram pesados e a produtividade de grãos por hectare estimada considerando-se o teor de umidade de 13%. Das mesmas plantas utilizadas para avaliar a severidade, coletaram-se folhas para determinar a concentração de Si, utilizando-se a metodologia proposta por Korndörfer et. al. (2004).

O delineamento experimental foi o de parcelas sub-subdivididas com quatro repetições. As parcelas corresponderam à aplicação de silicato de cálcio ou calcário, as sub-parcelas à aplicação ou não de fungicida e as sub-sub-parcelas às duas linhagens de sorgo. Os valores das variáveis avaliadas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Bartlett (Gomez & Gomez, 1994). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de Fisher (LSD, $P \leq 0.05$) utilizando-se o software Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os dados da concentração foliar de Si foram correlacionados com os dados de produção e da AACPA.

Resultados

Área abaixo da curva de progresso da doença: para o primeiro experimento, houve diferença significativa para os fatores aplicação ou não de silicato de cálcio (SC), pulverização ou não com fungicida (F) e linhagens (L) de sorgo e para as interações $L \times SC$, $L \times F$ e $SC \times F$ ($P \leq 0,01$) (Tabela 1). A aplicação de silicato de cálcio no solo reduziu a AACPA em 42 e 39%, respectivamente, nas linhagens BR009 e BR008 (Tabela 2). Independentemente da adição ou não do silicato de cálcio ao solo, a linhagem BR008 apresentou AACPA 89% menor do que a da linhagem BR009 (Tabela 2). A pulverização com fungicida reduziu a AACPA em 39 e 50%, respectivamente, nas linhagens BR009 e BR008 (Tabela 2). Na ausência do fungicida, houve redução de 88% na AACPA para a linhagem BR008 em relação à linhagem BR009. Na presença do fungicida, esta redução foi 90%

(Tabela 2). Para o segundo experimento, houve diferença significativa apenas para os fatores SC, L e F ($P \leq 0,01$) (Tabela 1). Para a linhagem BR008, observou-se uma redução de 81% na AACPA em relação à da linhagem BR009 (Tabela 6). A aplicação de silicato de cálcio ao solo reduziu a AACPA em 15% em relação à não aplicação desse produto. A aplicação de fungicida reduziu a AACPA em 30% (Tabela 6).

Produtividade: para o primeiro e o segundo experimentos, houve diferença significativa apenas para os fatores SC, L e F ($P \leq 0,01$). Para o primeiro experimento, a linhagem BR008 produziu 22 sacas/ha a mais do que a linhagem BR009 (Tabela 4). Com a aplicação de silicato de cálcio no solo, obtiveram-se 10 sacas/ha a mais em relação à não aplicação desse produto (Tabela 4). Com a aplicação de fungicida, obtiveram-se 8 sacas/ha a mais do que na ausência desse tratamento (Tabela 4). No segundo experimento, a linhagem BR008 produziu 14 sacas/ha a mais do que a linhagem BR009 (Tabela 6). Com a aplicação de silicato de cálcio no solo, obtiveram-se 12 sacas/ha a mais do que a não aplicação desse produto. Com a aplicação de fungicida, obtiveram-se 3 sacas/ha a mais em relação à não aplicação (Tabela 6).

Concentração foliar de Si: para o primeiro experimento, houve diferença significativa para os fatores SC e L e para a interação SC \times L ($P \leq 0,01$). A concentração foliar de Si aumentou significativamente com a aplicação de silicato de cálcio ao solo, independentemente da cultivar de sorgo. Não houve diferença significativa entre as duas linhagens para a concentração foliar de Si com a aplicação de calcário. Porém, com a aplicação de silicato de cálcio, a concentração foliar de Si foi significativamente maior para a linhagem BR008. Para o segundo experimento, houve diferença significativa ($P \leq 0,01$) apenas para o fator SC. A concentração foliar de Si foi 20 vezes maior nas plantas cultivadas na presença do silicato de cálcio do que na presença de calcário (Tabela 6).

Correlação de Pearson: para o primeiro experimento, a produtividade correlacionou-se significativamente e positivamente com a concentração foliar de Si, exceto quando não foi aplicado silicato de cálcio no solo. A correlação entre a concentração foliar de Si e a AACPA foi significativa e negativa apenas para as duas linhagens e com a aplicação do silicato de cálcio ao solo. Para o segundo

experimento, a concentração foliar de Si correlacionou-se positiva e significativamente com a produtividade, exceto na ausência ou presença do silicato de cálcio no solo. Não houve correlação entre a concentração foliar de Si e a AACPA, independentemente da aplicação ou não de fungicida, linhagens de sorgo e adição ou não de silicato de cálcio no solo (Tabela 7).

Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que a aplicação de Si em um solo deficiente nesse elemento foi eficiente para reduzir a severidade da antracnose do sorgo e, conseqüentemente, aumentar a produtividade, especialmente quando se utilizou uma linhagem suscetível. Estes resultados corroboram com relatos anteriores de que o Si é eficiente em reduzir a intensidade de algumas doenças no campo. Datnoff et al. (1991) aplicaram silicato de cálcio em um solo deficiente em Si nas doses de 0, 5, 10 e 15 ton ha⁻¹ e observaram uma redução na severidade da brusone no pescoço e da mancha parda de 31 e 15%, respectivamente, em relação à testemunha. Seebold (1998) demonstrou que a aplicação de 500 kg ha⁻¹ de Si em um solo deficiente nesse elemento reduziu a severidade da brusone nas folhas e no pescoço em 40 e 72%, respectivamente, em relação à testemunha, a qual não recebeu Si.

A linhagem BR008 apresentou maior concentração de Si quando comparada à BR009. Segundo Ma et al. (2003), a variação na concentração de Si em grãos de cevada é geneticamente controlada e pode ser associada à cultivares com capacidade diferenciada na absorção de Si pelas raízes, além de diferenças na translocação e deposição desse elemento. Em arroz e milho, já foram identificados genes que codificam proteínas transportadoras do ácido monossilícico (Ma et al., 2006, 2007; Mitani et al., 2009). No entanto, apesar de o sorgo ser uma espécie acumuladora de Si, a base genética do processo de absorção do Si pelas raízes e a translocação desse elemento é desconhecida. Assim, essas informações seriam de grande importância para o melhoramento de cultivares de sorgo visando a uma maior absorção do Si pelo sistema radicular.

O efeito residual do silicato de cálcio no solo contribuiu para diminuir a severidade da antracnose e aumentar a produtividade do sorgo em cultivos

posteriores, confirmando os resultados obtidos por Datnoff et al.(1991) e Seebold et al. (2004). A maior diferença de produtividade nas parcelas com aplicação de silicato de cálcio em relação à daquelas onde não foi aplicado esse produto no segundo ano de cultivo em relação ao primeiro ano deve-se, provavelmente, à menor pressão de inóculo presente nessa safra.

Apesar da aplicação de silicato de cálcio no solo ter resultado em uma menor redução na AACPD quando comparada com a pulverização de fungicida, esse decréscimo é bastante considerável, pois garantiria uma redução no número de aplicações de fungicida durante o ciclo da cultura. Isso se refletirá não apenas em ganhos econômicos para o produtor, mas também é uma estratégia que evitará a seleção de populações do patógeno resistentes aos fungicidas. Outros autores também relataram a interação Si × fungicidas. Datnoff & Snyder (1994) mostraram que a aplicação de 2000 kg ha⁻¹ de Si no solo para o controle da brusone não diferiu significativamente da aplicação do fungicida benomil. Em outro estudo, Seebold et al. (2004) também demonstraram que o Si, na dose de 1000 kg ha⁻¹, utilizado juntamente com a dose cheia do fungicida resultou em maior redução na intensidade da brusone. No entanto, o uso do Si em combinação com doses reduzidas do fungicida (10 e 25%) foram eficientes em reduzir a severidade da brusone tanto quanto a dose cheia do fungicida.

Diante do exposto, pode-se concluir que o Si pode ser utilizado no manejo da antracnose do sorgo em cultivares suscetíveis e moderadamente resistentes e, conseqüentemente, reduzir o número de aplicações de fungicidas.

Referências

- Ali, M. E. K. & Warren, H. L. 1987. Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. *Plant Disease* 71:402-404.
- Bélanger, R. R., Bowen, P. A., Ehret D. L., and Menzies, J. G. 1995. Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* 79:329-336.
- Cardwell, K. F., Hepperly, P. R., and Frederiksen, R. A. 1989. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease* 73:255-257.

- Casela, C. R., Pinto, M. F. J. A., Oliveira, E., and Ferreira, A. S. 1997. Sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. Pag: 1025-1064. Controle de doenças de plantas. Viçosa, MG: Departamento de Fitopatologia
- Datnoff, L. E., and Snyder, G. H. 1994. Comparison of silicon and benomyl alone and in combination for reducing blast incidence. *Biological and Cultural. Tests for Control of Plant Disease* 9:113.
- Datnoff, L. E., Deren, C. W., and Snyder, G. H. 1997. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Protection* 16:525-531.
- Datnoff, L. E., Rodrigues, F. A., and Seebold, K. W. 2007. Silicon and Plant Disease. Pages: 233-246. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. The American Phytopathological Society.
- Datnoff, L. E., Snyder, G. H., Raid, R. N., and Jones, D. B. 1991. Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. *Plant Disease* 75:729-732.
- Guimarães, F. B., Casela, C. R., Santos, F. G., Pereira, J. C. R., and Ferreira, A. S. 1999. Avaliação da resistência de genótipos de sorgo a antracnose. *Summa Phytopathologica* 25:308-312.
- Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., and Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440:688-691.
- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., and Yano, M. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448:209-212.
- Ma, J. F., Higashitani, A., Sato, H., Takeda, K. 2003. Genotypic variation in silicon concentration of barley grain. *Plant and Soil* 249:383-387.
- Mitani, N., Yamaji, N., and Ma, J. F. 2009. Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiology* 50:5-12.
- Pande, S., Mughogho, L. K., Badhiopadhyay, R., and Karunakar, R. I. 1991. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease* 75:778-783.
- Pande, S., Thakur, R. P., Karunakar, R. I., Bandyopadhyay, R., and Reddy, B. V. S. 1994. Development of screening methods and identification of stable resistance to anthracnose in sorghum. *Field Crops Research*. 38:157-166.
- Resende, R. R., Rodrigues, F. Á., Soares, J. M., and Casela, C. R. 2009. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal Plant Pathology*. 124:533-541.

Rodrigues, F. Á., and Datnoff, L. E. 2005. Silicon and rice disease management. *Fitopatologia Brasileira*. 30:457-469.

Rodrigues, F. Á., Datnoff, L. E., Korndörfer, G. H., Seebold, K. W., and Rush, M. C. 2001. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease*. 85:827-832.

Rodrigues, F. Á., Vale, F. X. R., Korndörfer, G. H., Prabhu, A. S., Datnoff, L. E., Oliveira, A. M. A., and Zambolim, L. 2003. Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection*. 22:23-29.

Savant, N. K., Snyder, G. H., and Datnoff, L. E. 1997. Silicon management and sustainable rice production. Pages 151-199 in: *Advances in Agronomy*. Academic Press, San Diego, CA.

Seebold, K. W., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, F. J., Kucharek, T. A., and Snyder, G. H. 2000. Effect of silicon rate and host resistance on blast, scald, and yield of upland rice. *Plant Disease*. 84:871-876.

Seebold, K. W., Kucharek, T. A., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, J. F., and Marchetti, M. A. 2001. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology*. 91:63-69.

Seebold, K. W., Jr., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, F. J., Kucharek, T. A., and Snyder, G. H. 2004. Effects of silicon and fungicides on the control of leaf and neck blast in upland rice. *Plant Disease*. 88:253-258.

Walters, D. R., and Bingham, I. J. 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology*. 151: 307-324.

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos da aplicação ou não de silicato de cálcio, linhagens de sorgo e pulverização ou não de fungicida na área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPD), produtividade e concentração foliar de silício (Si).

Fontes de Variação	g.l.	<i>P > F</i>		
		AACPA	Produtividade (sacas/ha)	Si (g/kg)
Experimento 1				
Silicato de cálcio (Si)	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Linhagens (L)	1	< 0.0001	< 0.0001	0.0093
Si × L	1	< 0.0001	0.8887	0.0171
Fungicida (F)	1	< 0.0001	< 0.0001	0.7333
Si × F	1	< 0.0001	0.2981	0.5265
L × F	1	< 0.0001	0.0744	0.5010
Si × L × F	1	0.0699	0.3053	0.3646
Experimento 2				
Silicato de cálcio (Si)	1	0.0429	< 0.0001	< 0.0001
Linhagens (L)	1	< 0.0001	< 0.0001	0.8195
Si × L	1	0.9071	0.1759	0.7805
Fungicida (F)	1	0.0004	0.0444	0.8195
Si × F	1	0.8720	0.5578	0.6314
L × F	1	0.3145	0.9908	0.4669
Si × L × F	1	0.2763	0.2089	0.7805

P > F = nível de significância do teste de F. g.l. = graus de liberdade.

Tabela 2. Efeito das interações linhagens de sorgo × aplicação ou não de silicato de cálcio e de linhagens de sorgo × pulverização ou não de fungicida na área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA) para o primeiro experimento.

Efeito	Linhagem	
	BR009	BR008
Sem Silicato de cálcio	1562 Aa	161,7 Ab
Com Silicato de cálcio	903,18 Ba	98,35 Bb
Sem Fungicida	1529,4 A a	173,5 Ab
Com Fungicida	935,78 B a	86,55 Bb

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0,05$).

Tabela 3. Efeito da interação aplicação ou não de silicato de cálcio × pulverização ou não com na área abaixo da curva de progresso da antracnose para o primeiro experimento.

Tratamentos	Sem Fungicida	Com Fungicida
Sem Silicato de cálcio	1091,7 Aa	632 Ab
Com Silicato de cálcio	611,2 Ba	390,4 Bb

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0,05$).

Tabela 4. Produtividade de grãos de sorgo em função da aplicação ou não de silicato de cálcio, linhagens de sorgo e pulverização ou não com fungicida para o primeiro experimento.

Tratamentos	Produtividade (sacas/ha)
Com Silicato de cálcio	20,20 a
Sem Silicato de cálcio	30,27 b
Linhagem BR009	13,99 a
Linhagem BR008	36,47 b
Sem Fungicida	21,58 a
Com Fungicida	28,88 b

Médias seguidas pela mesma letra para cada par de tratamentos não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0.05$).

Tabela 5. Efeito da interação linhagens de sorgo × aplicação ou não de silicato de cálcio na concentração de silício foliar (g/kg) para o primeiro experimento.

Tratamentos	Sem Silicato de Cálcio	Com Silicato de Cálcio
Linhagem BR009	0,31 Aa	8,53 Ab
Linhagem BR008	0,51 Aa	12,07 Bb

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0.05$).

Tabela 6. Área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA), produtividade de grãos de sorgo e concentração foliar de silício (Si) em função da aplicação ou não de silicato de cálcio, linhagens de sorgo e pulverização ou não com fungicida para o segundo experimento.

Tratamentos	AACPD	Produtividade (sacas/ha)	Si (g/Kg)
Sem Silicato de Cálcio	618,79 a	21,76 a	0,29 a
Com Silicato de cálcio	727,89 b	33,81 b	5,9 b
Linhagem BR009	1127,11 a	34,71 b	3,06 a
Linhagem BR008	219,57 b	20,86 a	3,12 a
Sem Fungicida	790,78 a	26,10 a	3,12 a
Com Fungicida	555,9 b	29,48 b	3,06 a

Médias dentro de cada coluna, para cada par de tratamentos, não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher ($P \leq 0.05$).

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson da produtividade e área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA) com a concentração foliar de silício (Si) na ausência (-) ou presença (+) de fungicida, para cada linhagem de sorgo e aplicação (+) ou não (-) de silicato de cálcio para os dois experimentos.

	Fungicida		Linhagens		Silicato de cálcio	
	-	+	BR008	BR009	-	+
Experimento 1						
Si × produtividade	0,52 [*]	0,48 [*]	0,75 ^{**}	0,53 [*]	0,13 ^{ns}	0,52 [*]
Si × AACPA	- 0,40 ^{ns}	- 0,36 ^{ns}	- 0,49 [*]	-0,64 ^{**}	-0,23 ^{ns}	- 0,52 [*]
Experimento 2						
Si × produtividade	0,54 ^{**}	0,61 ^{**}	0,78 ^{**}	0,76 ^{**}	0,13 ^{ns}	0,09 ^{ns}
Si × AACPA	- 0,77 ^{ns}	- 0,13 ^{ns}	- 0,43 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,02 ^{ns}

^{ns}, * e ** = não significativo, significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

CAPÍTULO 4

SILÍCIO NA POTENCIALIZAÇÃO DA RESPOSTA HORMONAL ENVOLVIDA NA RESISTÊNCIA DO SORGO À ANTRACNOSE

Silício na potencialização da resposta hormonal envolvida na resistência do sorgo à antracnose

Resumo

O Silício (Si) tem efeitos benéficos no crescimento e produção das plantas amenizando os estresses bióticos e abióticos incluindo doenças, pragas, seca e desbalanço nutricional. Esse efeito benéfico do Si é mais evidente sob condições de estresse. No entanto, o exato mecanismo que o Si atua aumentando a resistência das plantas ainda é desconhecido. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi elucidar os mecanismos pelos quais o Si aumenta a resistência do sorgo a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum*, investigando as rotas de sinalização hormonal. Para isto, a linhagem de sorgo (BR009) foi crescida em solução nutritiva suprida (2 mM) ou não (0 mM) com Si. Além de o Si reduzir a severidade da antracnose, esse elemento também alterou as vias de sinalização hormonal ativadas por *C. sublineolum*, pois os transcritos dos genes marcadores como ACC oxidase, GH3.1 e também dos genes relacionados com as vias do ácido jasmônico e do ácido salicílico foram induzidos nas plantas inoculadas e supridas com Si. Os resultados deste estudo sugerem que o Si pode interagir com muitos componentes chaves do sistema imune do sorgo, potencializando sua resistência ao patógeno.

Palavras-chave: silício, hormônios, defesa, antracnose

Introdução

É sabido que os hormônios regulam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Leyser, 2006; Teale et al., 2006). Muitos estudos suportam a idéia de que as vias de sinalização em plantas são compostas de redes intrincadas que interagem mutuamente permitindo que a planta responda aos diferentes tipos de estímulos ambientais (Achard et al., 2006; Fu & Harberd, 2003; Halliday, 2004). Deste modo, existem evidências de que os hormônios regulam respostas das plantas ao ambiente, especialmente aquelas relacionadas ao ciclo de vida e às condições adversas ao crescimento, incluindo muitos tipos estresses. Sob o ataque de patógenos, a quantidade, a composição e o momento da

combinação de hormônios produzidos pelas plantas variam entre as espécies e dependem do estilo de vida e da estratégia de infecção do patógeno. Este sinal resulta na ativação de um grupo específico de genes relacionados com a defesa, os quais determinam a natureza e a efetividade da resposta que é ativada pelo patógeno. Os hormônios ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) exercem papéis importantes na regulação das respostas de defesa das plantas contra vários patógenos (Dong, 1998). Embora em muitos patossistemas seja claro o envolvimento do AS na resistência a patógenos biotróficos e do JA na resistência aos necrotróficos, existem muitas exceções para esta regra. Recentemente, novos estudos indicam que outros compostos hormonais, especialmente as auxinas, estão envolvidos na resposta das plantas ao stress.

Por outro lado, alguns patógenos podem manipular essas vias de sinalização reguladas por hormônios na tentativa de suprimir as respostas de defesa do hospedeiro. O fato de que os patógenos podem produzir hormônios como parte de sua estratégia de colonização tem sido bem documentado como, por exemplo, para *Botrytis cinerea*, um patógeno necrotrófico que produz ET. Além disso, várias bactérias também são capazes de produzir auxina para desencadear o processo infeccioso nos seus hospedeiros (Glickmann et al., 1998).

Um dos papéis mais importantes do silício (Si) é o aumento da resistência das plantas, especialmente as monocotiledôneas, ao ataque por patógenos (Datnoff et al., 2007). No entanto, apesar de muitos estudos demonstrarem um papel ativo desse elemento na resistência das plantas às doenças, nada se conhece sobre as vias de sinalização que envolve os múltiplos mecanismos de defesa modulados por esse elemento.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi elucidar os mecanismos pelos quais o Si aumenta a resistência do sorgo a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum*, investigando as rotas de sinalização hormonal.

Material e Métodos

Preparação da solução nutritiva: a solução nutritiva foi preparada segundo Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações: 3,0 mM KNO₃; 0,5 mM NH₄H₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄·7H₂O; 2,0 mM Ca(NO₃)·4H₂O; 0,30 μM

CuSO₄·5H₂O; 0,33 μM ZnSO₄·7H₂O; 11,5 μM H₃BO₃; 3,5 μM MnCl₂·4H₂O; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 50 μM FeSO₄·7H₂O e 50 μM EDTA bissódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410) (Ma et al., 2002) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol Si/L (+Si).

Crescimento das plantas de sorgo: sementes de sorgo da linhagem CMSXS142 [BR 009 (Tx623) - Texas], suscetível à antracnose (Carlos R. Casela, Comunicação Pessoal), foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por dois minutos, seguidas de lavagem em água destilada por três minutos e germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidos a 25°C por 6 dias. Cinco plântulas foram transferidas para vasos plásticos de 5 litros contendo solução nutritiva 1/2 de força iônica da solução anteriormente citada, mas sem adição de Si. Após 7 dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total, adicionando-se ou não o ácido monossilícico. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

Obtenção do inóculo de *C. sublineolum* e inoculação das plantas: as plantas de sorgo foram inoculadas com um isolado monospórico de *C. sublineolum* (CNPMS-12) fornecido pelo Laboratório de Resistência às Doenças da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG. O isolado de *C. sublineolum*, armazenado em tubos de ensaio com BDA contendo óleo mineral, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (aveia 60 g/L e ágar 17g/L). Após a repicagem do fungo, as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C, onde permaneceram por até 10 dias até ocorrer abundante crescimento micelial. Em seguida, foi feita uma raspagem superficial do micélio e as placas foram transferidas para câmara de crescimento com luz constante e temperatura de 25°C para ocorrer a esporulação do fungo. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 ml de água destilada em cada placa fazendo-se uma raspagem superficial, com espátula, para liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de 1×10^6 conídios/mL, pela

contagem em hemacitômetro, contendo Tween 20 (0,1 ml/100 ml de suspensão). As plantas crescidas em casa de vegetação foram inoculadas aos 30 dias de idade. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro a 25°C e umidade relativa de \approx 90%. Após 18 h no escuro, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 26°C e umidade relativa de \approx 50% onde permaneceram até o final das avaliações.

Avaliação da severidade da antracnose: a severidade foi avaliada aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (dai) das plantas utilizando-se a escala diagramática de Sharma (1983).

Extração do RNA, síntese de cDNA e análise da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR): o RNA total foi obtido de tecidos de folha armazenados em freezer -80 utilizando-se o “Invisorb Spin Plant RNA Mini kit” (Invitek, Berlin, Germany) e, subsequentemente, tratado com “turbo DNase” de acordo com o protocolo do fabricante (Ambion, Applied Biosystems, Lennik, Bélgica). Antes da síntese da primeira fita de cDNA, a ausência de DNA genômico foi confirmada por PCR. A concentração de RNA foi checada antes e depois da digestão com “turbo DNase”. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 μ g de RNA total usando o “affinityscript reverse transcriptase” e oligo dT primers (Stratagene, Bio-Connect, Huissen, The Netherlands). As seqüências de nucleotídeos dos primers encontram-se na Tabela 1. Para cada par de primers, as temperaturas ótimas de anelamento foram pré- determinadas pelo gradiente PCR em termociclador. Somente pares de primers com eficiência entre 90 e 110% foram usados para os estudos de expressão. Quantitativas amplificações de PCR foram conduzidas utilizando-se “Mx3005P real-time PCR detection system” (Stratagene, Amsterdam, Holland), usando “Sybr máster mix” (Stratagene, Bio-Connect, Huissen, The Netherlands) para monitorar a síntese de dsDNA. A expressão dos genes Sb06g003010, CF772606, BI245631, BF705195 e BF586333 foi avaliada em triplicata em um volume total de 20 μ L incluindo o corante de referência passiva ROX de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene). A quantidade de RNA em cada amostra foi normalizada utilizando-se a actina como controle interno e amostras do primeiro tempo de coleta das plantas não

inoculadas foram selecionadas como calibrador. Os dados gerados foram analisados no software Mx3005P (Stratagene).

Tabela 1. Primers específicos utilizados para o RT-qPCR.

Possível proteína	Acesso no Genbank	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
Actina	Sb06g003010	TCACAGCTCATGGCCGAGC G	GGGTTGGCTCGGTGAAGG CA
Proteína induzida Benzotiadiazole	CF772606	ACCAGCAGCAACGACCAA CGAG	CCAGCAGCATCAAGCAAA CAAG
Proteína regulada por Acido Jasmonico	BI245631	AGCGCAGAGGAGGATCCA TGAG	TTGCCATCAACAGGGCCA TCGG
GH 3.1	Sb03g036680	CGACCGCAAGCTGATTCCC G	ATGCGCGTGAGGATGGTG CG
1-aminocicloproprano 1-carboxilato oxidase	BF705195	ACAAACTCAGCCTGCCTGC CTC	AAGTTGGCGTAGTGCGCC TTGG
Lipoxigenase	BF586333	CGGCGGCCTCTTCGAGACA AC	TGCCAGATTGCCAGCCCC TC

Resultado e Discussão

A severidade da antracnose nas plantas supridas com Si foi crescente dos 3 até aos 9 dias, onde atingiu 100% (Fig. 1). Nas plantas não supridas com Si, o progresso da antracnose foi mais lento, com severidade máxima de 12% aos 11 dias (Fig. 1).

Os jasmonatos são derivados do ácido linoléico, resultado da ação de lipoxigenases (Hamberg & Gardner, 1992). Os níveis de AJ aumentam localmente em resposta à infecção pelo patógeno e tem importante papel na resistência basal e induzida (Turner et al., 2002). Apesar da maioria dos casos o AJ está envolvido na resistência contra patógenos necrotróficos, a resistência contra os biotróficos e hemibiotróficos também pode ocorrer. No presente trabalho, o gene responsável por codificar uma proteína regulatória na via do AJ foi induzido às 48 hai em plantas inoculadas com *C. sublienolum* e supridas com Si, com expressão, aproximadamente, 200 vezes maior do que o observado nas plantas do tratamento controle (plantas não inoculadas e não supridas com Si) (Fig. 2). Às 72 hai, observou-se uma redução no nível de expressão desse gene. Para o gene da lipoxigenase, também foi observado um pico às 48 hai, seguido de decréscimo na expressão (Fig. 2). Esses resultados indicam que o Si interferiu na via de sinalização do AJ potencializando a expressão da resposta de defesa do sorgo e resultando em um aumento do nível de resistência contra *C. sublienolum*.

O AS é um hormônio que está presente em muitas plantas em vários níveis e está envolvido na resistência sistêmica adquirida (RSA) sendo associado com a reprogramação transcricional de vários genes relacionados à defesa, incluindo as proteínas relacionadas com a patogênese (PR-proteínas) que podem apresentar natureza antimicrobiana (Vlot et al., 2009). O benzothiadiazole, um produto sintético, análogo ao AS também induz RSA em várias espécies de plantas. No presente estudo, observou-se que às 48 hai houve um aumento na expressão do gene que codifica uma proteína induzida pelo benzothiadiazole (Fig. 2). Esse pico ocorreu nas plantas inoculadas e supridas com Si, indicando que esse elemento pode atuar como modulador de eventos da sinalização do AS exercendo, desta forma, um importante papel na resistência local e também sistêmica.

A auxina é um outro hormônio envolvido na modulação das respostas de defesas das plantas, e alguns estudos mostram que a inibição na biossíntese ou na sinalização desse hormônio é parte do mecanismo de defesa mediado pelo AS (Wang et al. 2007). Muitos patógenos produzem auxina durante a colonização das plantas visando manipular a resistência dos seus hospedeiros (Spaepen et al., 2007). Alguns estudos mostram que certas espécies de *Colletotrichum* produzem auxina em meio de cultura (Maor et al., 2004). A GH3.1 consiste de uma família de genes que codificam IAA-amino sintetases que são responsáveis pela homeostase hormonal através da conjugação do excesso de formas livres do IAA à aminoácidos (Staswick et al., 2005). Desta forma, um aumento na expressão do GH3.1 resulta em uma depleção na sinalização da auxina levando a ativação de genes de defesa. Verificou-se neste trabalho que o gene GH3.1 foi induzido às 24 hai nas plantas inoculadas e supridas com Si, atingindo máxima expressão às 48 hai (Fig. 2). Esses resultados indicam que o Si pode interferir no mecanismo regulatório da auxina por meio da ativação do gene GH3.1.

O ET é um hormônio volátil que têm importante função na regulação do crescimento das plantas e participa nas respostas de defesa ao estresses bióticos e abióticos (Wang et al., 2002). A enzima *ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase* (ACC oxidase) participa da última etapa da biossíntese do etileno e tem atividade frequentemente aumentada em resposta ao stress (Wang et al., 2002). Plantas deficientes na sinalização do etileno podem apresentar aumento ou redução na suscetibilidade à patógenos (Bent et al., 1992; Hoffman et al., 1999). Analisando a expressão do gene que codifica para uma ACC oxidase, observou-se um pico na indução às 48 hai nas plantas inoculadas e supridas com Si (Fig. 2), indicando que o ET pode contribuir para a resistência do sorgo à antracnose na presença de Si.

O Si parece interferir nas vias de sinalização hormonal ativadas por *C. sublineolum*, pois muitos transcritos de genes marcadores como ACCoxidase, GH3.1e genes relacionados às vias do ácido jasmônico e do ácido salicílico foram induzidos nas plantas inoculadas e supridas com Si. Os resultados deste estudo sugerem que o Si pode interagir com muitos componentes chaves do sistema imune do sorgo, potencializando sua resistência ao patógeno.

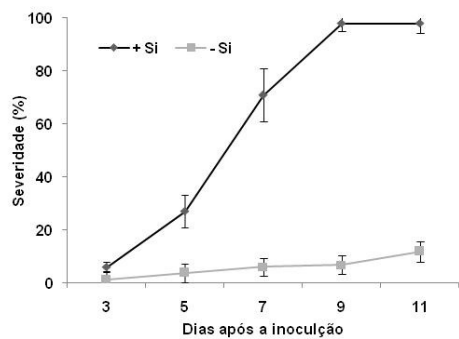


Figura 1. Progresso da antracnose avaliado na quinta e na sexta folhas de plantas de sorgo supridas (+Si) ou não (-Si) com silício na solução nutritiva.

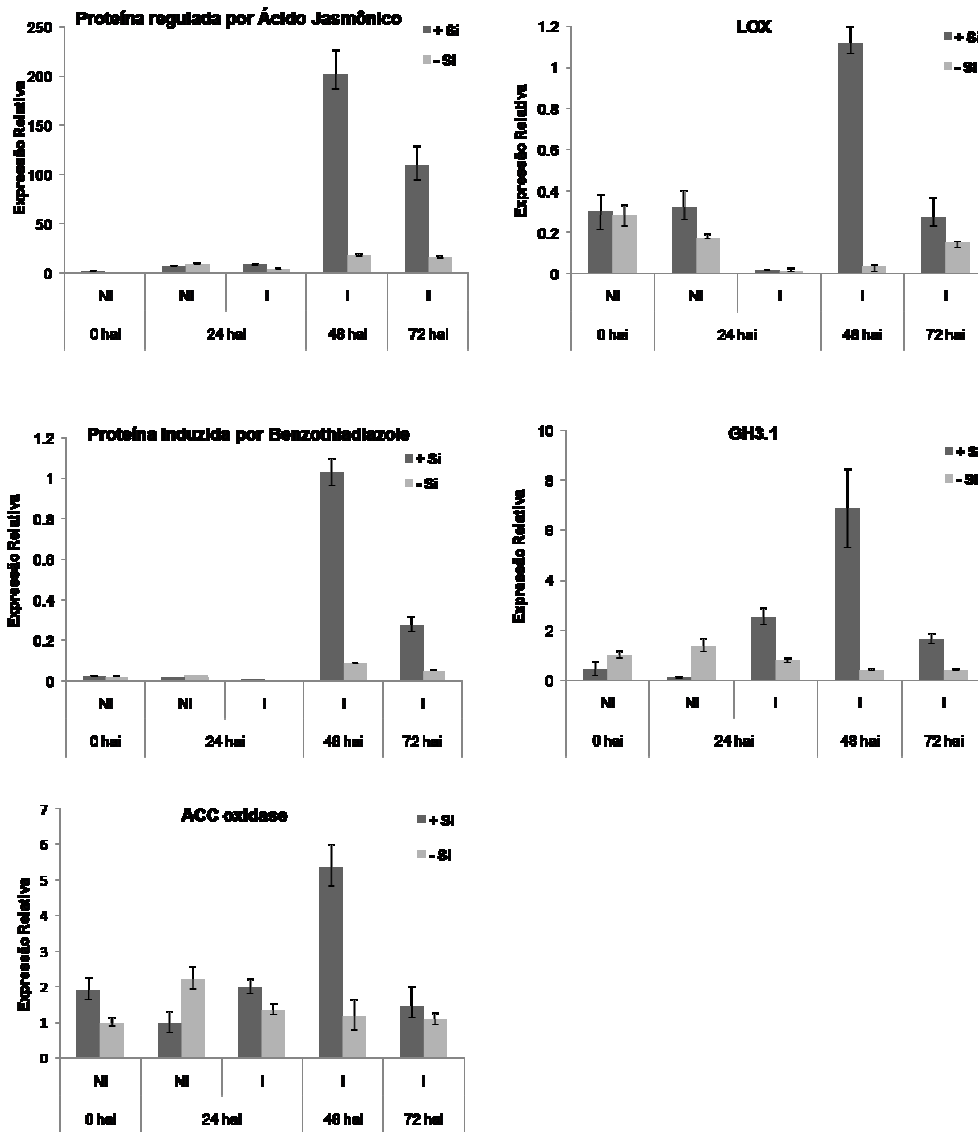


Figura 2. Análise da expressão de genes em folhas de plantas de sorgo supridas (+Si) ou não (-Si) com silício e inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*. Plantas não inoculadas com *C. sublineolum* (0 hai) serviram com controle. O nível de expressão relativa dos genes correspondeu ao aumento da expressão em relação ao calibrador da amostra em plantas não supridas com Si e não inoculadas com o fungo (0 hai) normalizados utilizando-se actina como referência interna. As barras são médias (\pm desvio padrão) de três repetições de amostras obtidas de um experimento representativo.

Referências

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*. 311:91-94
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R., and Staskawicz, B. J. 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular. Plant-Microbe Interact.* 5:372-378.
- Datnoff, L. E., Rodrigues, F. A., and Seebold, K. W. 2007. Silicon and Plant Disease. Pages: 233-246. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. The American Phytopathological Society
- Dong, X. N. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1:316–323.
- Elad, Y. 1990. Production of ethylene in tissues of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 36:277-287.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., and Dessaux, Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular. Plant Microbe Interact.* 11:156-162.
- Halliday, K.J. 2004. Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Current Biology*. 14:1008-1010
- Hamberg, M., and Gardner, H. W. 1992. Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1165:1-18
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X., and Bent, A.F. 1999. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*. 119: 935-950.
- Leyser, O. 2006. Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Current Biology*. 16:424-433.
- Lund, S.T., Stall, R. E., and Klee, H. J. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*. 10:371-382.
- Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H., Sharon, A. 2004. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*.70:1852-1854.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31:425-448

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryak, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., Suza, W. 2005. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*. 17:616-627

Teale, W. D., Paponov, I. A., and Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development *Nature Reviews Molecular Cell* 7:847-859.

Turner, J.G., C. Ellis and A. Devoto. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: S153-64.

Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat. *Annual Reviews of Phytopathology*. 47:177-206.

Wang, K.L., Li, H., and Ecker, J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*. S131-S151.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*. 17:1784-1790.

Wang, K.; Li, H. and Ecker, J. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*. S131-S151

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que:

O Si além de atuar como barreira física, está envolvido em atividades metabólicas especialmente em plantas submetidas a condições de estresse

O Si afetou a fisiologia das plantas de sorgo infectadas por *C. sublineolum* auxiliando-as na manutenção da integridade da membrana plasmática e sem grandes alterações na fotossíntese

O Si pode ser utilizado no manejo da antracnose do sorgo no campo em cultivares suscetíveis e moderadamente resistentes, visando redução da doença e ganhos na produção

O Si parece interferir nas vias de sinalização hormonal ativadas por *C. sublineolum*, pois muitos transcritos de genes marcadores como ACCoxidase, GH3.1 e genes relacionados às vias do ácido jasmônico e do ácido salicílico foram induzidos nas plantas inoculadas e supridas com Si.