

LEONORA RODRIGUEZ POLANCO

**CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO COM SILÍCIO E
MOLIBDÊNIO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA POTENCIALIZADOS
PELO SILÍCIO**

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

R696c
2011

Rodriguez Polanco, Leonora, 1971-

Controle da antracnose do feijão com silício e molibdênio e
mecanismos de resistência potencializados pelo silício /
Leonora Rodriguez Polanco. – Viçosa, MG, 2011.
xvii, 96f. : il. ; 29cm.

Orientador: Francisco Xavier Ribeiro do Vale.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão - Doenças e pragas. 2. Silício. 3. Antracnose.
4. *C. Lindemuthianum*. I. Universidade Federal de Viçosa. II.
Título.

CDD 22. ed. 635.65294

LEONORA RODRIGUEZ POLANCO

**CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO COM SILÍCIO E
MOLIBDÊNIO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA POTENCIALIZADOS
PELO SILÍCIO**

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: 15 de julho de 2011.

Prof. Fabrício Ávila Rodrigues
Coorientador

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior

Pesq. Rogério Faria Vieira

Profa. Rosangela D'Arc de Lima Oliveira

Prof. Francisco Xavier Ribeiro do Vale
Orientador

*Aos meus pais Isaura e
Jorge e às minhas irmãs Elizabeth,
Diana e Astrid:*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por mais esta oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, por terem-me proporcionado condições para realizar este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo recurso financeiro (Processo APQ-01169-09).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Professor Fabrício de Ávila Rodrigues, pela orientação, pelo apoio, pela amizade e por seu exemplo de disciplina, competência e profissionalismo.

Ao Professor Francisco Xavier Ribeiro do Vale, pelo aconselhamento, pelos ensinamentos, pelo apoio e, sobretudo, pela amizade.

Ao Professor Fábio Murilo DaMatta, pelo apoio, pelas sugestões e colaborações nas etapas do trabalho.

Aos Pesquisadores da EPAMIG Dr. Trazilbo José de Paula Júnior e Dr. Rogério Faria Vieira, pelo aconselhamento, incentivo e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

Aos estudantes Fernando W. Neves, Pablo Schulman, Leandro Andrade, Isaias S. Cacique, Cristianne Milagres e Rafael Kenji, pela amizade, pelo companheirismo e pela ajuda na execução dos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Epidemiologia e Controle Antonio J. Macabeu, Eder, Gisele, Adriano, Ramirez e Bruno e aos meus demais colegas, pela cooperação, convivência diária, pelo respeito, pela afeição e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigas do Laboratório de Interação Planta-Patógeno, em especial a Kelly, Maria Fernanda, Carmen, Ivanette e Maria Bianne, pelo companheirismo, pela amizade e ajuda incondicional durante a execução deste trabalho.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório da Interação Planta-Patógeno, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda na execução dos experimentos.

A todas as pessoas do Laboratório de Metabolismo Vegetal, em especial a Nelson, Paulo Cezar e Samuel, pelo companheirismo e pela ajuda nas análises fisiológicas.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do Departamento de Fitopatologia Marcos Fernando, Aline, Janaina, Cristian Javier, André, Lorena e Nadson, pela amizade, pelo auxílio e convívio agradável.

Aos meus colegas do Doutorado, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos meus amigos de Corpoica e, em especial a Luz Maria, Nidia, Fabiola, Clara, Gilma Jaime M, Jairo A, Victor Hugo, Jairo R, Jesus Antonio e Jose Manuel, por terem-me acolhido com carinho desde quando iniciei a minha vida laboral, pela sua colaboração e pelo apoio.

Ao Ricardo, pelo apoio incondicional e carinho de sempre.

Às diretivas de Corpoica, em especial ao ex-diretor nacional Dr. Arturo Enrique Veja Varón, por ter-me concedido a Comissão de Estudos e pela colaboração que sempre me prestou.

Ao Professor Gaspar Henrique Korndörfer, pela realização das análises de silício.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Bruno, Braz, Camilo, Délio e Sara, pela colaboração.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
 CAPÍTULO 1 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE MEDIADA PELO SILÍCIO	 6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
 CAPÍTULO 2 FOTOSSÍNTESE E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR <i>COLLETOTRICHUM</i> <i>LINDEMUTHIANUM</i>	 36
RESUMO	37

ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	42
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
CAPÍTULO 3 CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO COM SILÍCIO, MOLIBDÊNIO E FUNGICIDA.....	64
RESUMO	65
ABSTRACT.....	67
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	73
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CONCLUSÕES GERAIS	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE MEDIADA PELO SILÍCIO	6
Tabela 1 - Concentração foliar de silício (Si), período de incubação (PI), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) e severidade estimada pelo software QUANT (SEQ) em plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 19		
CAPÍTULO 2	FOTOSSÍNTESE E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR <i>COLLETOTRICHUM</i> <i>LINDEMUTHIANUM</i>	36
Tabela 1 - Concentração de silício (Si) e severidade (Sev) da antracnose em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 48		
Tabela 2 - Correlação de Pearson entre as variáveis concentração foliar de silício (Si), severidade (Sev) da antracnose, taxa de assimilação líquida do CO ₂ ($A_{máx}$), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e taxa de concentração de CO ₂ interna vs. ambiente (C_i/C_a) 54		
CAPÍTULO 3	CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO COM SILÍCIO, MOLIBDÊNIO E FUNGICIDA.....	64

Tabela 1 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadia (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área foliar sadia (HAD), radiação interceptada pela área foliar sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 1	79
Tabela 2 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>C. lindemuthianum</i> e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 1	80
Tabela 3 - Quadrado médio das variáveis severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da doença (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> experimento 1	81
Tabela 4 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadia (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área foliar sadia (HAD), radiação interceptada pela área foliar sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 2	82

Tabela 5 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>C. lindemuthianum</i> e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 2	83
---	----

Tabela 6 - Quadrado médio das variáveis severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da doença (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> experimento 2	84
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE MEDIADA PELO SILÍCIO	6
Figura 1 -	Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L ⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.....	20
Figura 2 -	Concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol de silício L ⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.....	21
Figura 3 -	Atividade de peroxidases (POX) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L ⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.....	21

- Figura 4 - Atividade de polifenoloxidasas (PPO) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade. 23
- Figura 5 - Atividade de fenilalanina amônia-liases (FAL) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade. 23
- Figura 6 - Atividade de quitinases (QUI) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade. 24
- Figura 7 - Atividade de β -1,3-glucanases (GLU) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade. 24
- Figura 8 - Atividade de lipoxigenases (LOX) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos

tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.	25
CAPÍTULO 2 FOTOSSÍNTESE E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR <i>COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM</i>	36
Figura 1 - Condutância estomática (g_s) (a), taxa de transpiração (E) (b), taxa de concentração de CO_2 interna vs. ambiente (C_i/C_a) (c) e taxa de assimilação líquida do CO_2 ($A_{máx}$) (d), determinadas em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras indicam o desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	49
Figura 2 - Concentração de clorofilasea (Cl_a) (a), clorofila b (Cl_b) (b) e relação clorofila a/b (c) e carotenoides (d) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	50
Figura 3 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	51
Figura 4 - Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada	

ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	52
Figura 5 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	52
Figura 6 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	53
Figura 7 - Atividade da redutase da glutatona (RG) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.....	53

RESUMO

RODRIGUEZ POLANCO, Leonora, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Controle da antracnose do feijão com silício e molibdênio e mecanismos de resistência potencializados pelo silício.** Orientador: Francisco Xavier Ribeiro do Vale. Coorientadores: Fabrício Ávila Rodrigues e Fábio Murilo DaMatta.

Embora não seja reconhecido como nutriente essencial às plantas, o silício (Si) diminui a severidade de doenças em dicotiledôneas com menor capacidade de acumulação desse nutriente. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do silício em alguns componentes de resistência da planta de feijoeiro à antracnose causada por *C. lindemuthianum*, bem como quantificar as respostas fisiológicas e bioquímicas potencializadas por esse elemento. Para isso, foram avaliados alguns componentes da resistência em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) (ácido monossilício), bem como alguns fatores bioquímicos e fisiológicos associados com a resistência das plantas de feijoeiro ao fungo. Os resultados indicaram que o fornecimento do Si foi eficiente em atrasar o início da epidemia e reduzir a área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) e a severidade. Verificou-se incremento na atividade das enzimas fenilalanina amônia liases e lipoxigenases e na concentração de metabólitos, como a lignina, envolvidos na respostas de resistência do hospedeiro ao patógeno. No entanto, não foi constatado envolvimento do Si em alterações na concentração de compostos fenólicos solúveis totais e na atividade das enzimas β -1,3-glucanases, peroxidases e polifenoloxidasas. Ao analisar o envolvimento do Si na diminuição do estresse biótico causado pela antracnose na fotossíntese, observou-se incremento na taxa de assimilação líquida do carbono ($A_{máx}$) e na condutância estomática (g_s) e decrescimento na relação concentração de CO_2 intercelular/concentração de CO_2 do ambiente (C_i/C_a), indicando menor inibição metabólica na fixação de CO_2 nas plantas

de feijoeiro que receberam Si. As concentrações de clorofila *a* e *b* e carotenoides aumentaram na presença do Si, sugerindo a maior eficiência fotorreceptora e fotoproteção do sistema fotossintético. A aplicação radicular de Si resultou na alteração de enzimas envolvidas na produção e catabolismo de espécies reativas de oxigênio, em que foi verificado o aumento das enzimas ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) e diminuição na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O Si não teve efeito na atividade da catalase (CAT). Também, foi estudado o efeito da aplicação foliar de silicato de potássio (KSi) e molibdato de amônio (NaMo) sobre a antracnose, produção de grãos, desenvolvimento e duração da área foliar no feijoeiro. A aplicação foliar de KSi diminuiu a AACPA e aumentou a produção de grãos em 25%, em comparação com as plantas sem aplicação. Conjectura-se o efeito direto desse sal de silicato sobre o desenvolvimento do patógeno e indireto pelo impedimento na penetração devido à formação de uma barreira física formada pela deposição do silicato na folha. A aplicação de NaMo incrementou significativamente a área foliar, o que ocorreu em razão, provavelmente, do seu envolvimento no metabolismo do nitrogênio. O NaMo reduziu a intensidade da doença possivelmente pelo seu efeito tóxico como metal pesado sobre o fungo. Os efeitos aqui relatados do KSi e NaMo sugerem a sua incorporação em um sistema de manejo integrado com efeitos positivos na redução da epidemia, no incremento na produção de grão e no ambiente.

ABSTRACT

RODRIGUEZ POLANCO, Leonora, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.
Control of bean anthracnose with silicon and molybdenum and resistance mechanisms enhanced by silicon. Adviser: Francisco Xavier Ribeiro do Vale. Co-Advisers: Fabrício Ávila Rodrigues and Fábio Murilo DaMatta.

Although it is not recognized as an essential nutrient to the plants, Silicon (Si) reduces disease severity in dicotyledons with less capacity of accumulation of this nutrient. The objective of this work was to evaluate the effect of silicon in some components of resistance in bean plants to anthracnose caused by *C. lindemuthianum*, as well as to quantify physiological and biochemical responses enhanced by this element. Thus, it was evaluated some components of resistance in beans plants (cv. Pérola) grown in nutritive solution with (+Si) or without (-Si) monosilicic acid as well as some biochemical and physiological factors associated with the resistance of bean plants to fungus. Results indicate that supply of Si was efficient in delaying the beginning of the epidemic and reducing the area below anthracnose progress curve (ABAPC) and severity. An increase was found in the activity of phenylalanine ammonia-lyase and ϵ lipooxygenase and in the concentration of metabolites as for example lignin involved in the response to resistance to the host of the pathogens. However no involvement of Si was found in concentrations changes of total soluble phenolic compounds and in the activities of enzymes β -1,3-glucanases, peroxidases and polyphenoloxidase. When the involvement of Si in the reduction of biotic stress caused by anthracnose in the photosynthesis was being analyzed, an increase in rate of carbon net assimilation (A_{max}) and in the stomatal conductance (g_s) and a decrease in the intercellular CO_2 concentration/environment CO_2 concentration ratio (C_i/C_a) were found, indicating a lower metabolic inhibition

in CO₂ in Si-supplied bean plants. Concentrations of chlorophyll *a* and *b* and carotenoids increased in the presence of Si, suggesting a more efficient photoreceptor and photoprotection of the photosynthetic system. Root application of Si resulted in the alteration of enzymes involved in the production and catabolism of reactive oxygen species, in which an increase of ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) and a decreased production of hydrogen peroxide (H₂O₂) were found. Silicon did not the activity of catalase (CAT). The effect of foliar application of potassium silicate (KSi) and ammonium molybdate (NaMo) on anthracnose, grain yield, development and leaf area duration in the bean plant were also studied. Foliar application of KSi decreased AACP and increased grain production by 25% compared with plants without application. It is conjectured the direct effect of this silicate salt on the development of the pathogen and the indirect effect by preventing penetration due to the formation of a physical barrier formed by deposition of the silicate on the leaf. Application of NaMo significantly increased leaf area, which was a consequence of its involvement in nitrogen metabolism. NaMo reduced the intensity of the disease possibly due to its toxic effect as a heavy metal on the fungus. The effects of KSi and NaMo reported in this study suggest that its incorporation into an integrated management system with positive effects on the reduction of the epidemic, the increase in grain production and on the environment.

INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado, mundialmente, a leguminosa mais importante para a alimentação de cerca de 300 milhões de pessoas. Destaca-se na alimentação humana por ser fonte rica em proteínas e apresentar alto teor de lisina, de carboidratos, de sais minerais e de fibras alimentares. Essa leguminosa representou em 2004 a sexta fonte de proteínas dos brasileiros, sendo superada apenas pela soja, trigo, carne de ave e bovina e pelo leite (FAO).

Na safra 2006/2007 foram cultivados, no Brasil, mais de quatro milhões de hectares de feijão, com produção estimada de 3,3 milhões de toneladas de grãos nas três safras. As Regiões Nordeste, Sul e Sudeste são as maiores produtoras de feijão. O Estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor brasileiro com mais de 16% da produção nacional, superado somente pelo Paraná, com cerca de 30% (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2009).

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diferentes sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro-comum tem grande importância econômica e social. A cultura do feijoeiro, dependendo da cultivar e da temperatura ambiente, pode apresentar ciclos que variam de 65 a 100 dias, o que a torna apropriada para compor desde sistemas agrícolas intensivos irrigados, altamente tecnificados, até aqueles com baixo uso tecnológico, principalmente na agricultura de subsistência (Embrapa Arroz e Feijão, 2009).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib., é uma das doenças mais comuns e severas que atacam a cultura do feijoeiro no Brasil e está presente nos Estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, da Bahia, de Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e da Paraíba (Pria et al., 1999). A doença surge na lavoura pela presença do patógeno nos restos culturais ou pela utilização de sementes infectadas, sendo as

perdas na produtividade maiores quando as plantas são infetadas nos estádios iniciais de crescimento (Vieira, 1988).

O patógeno infecta plantas de feijoeiro em todos os estádios de desenvolvimento, atacando folhas, caule, ramos, vagens e sementes (Araújo, 1988). Plantas jovens geralmente são mais suscetíveis ao ataque do patógeno do que as plantas adultas, por possuírem tecidos menos lignificados. Os sintomas da antracnose podem aparecer em toda a parte aérea das plantas oriundas de sementes infectadas. Nas plântulas, observam-se lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo, as quais ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras. Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escura ou pardas que atingem, inicialmente, as nervuras principais, estendendo-se até as secundárias à medida que ocorre o progresso da doença. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas, de tamanho variável e com o centro claro, sendo delimitadas por um anel negro, um pouco saliente, rodeado por uma borda de cor café avermelhada. Quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis, uma massa de conídios de coloração rosada é formada no centro das lesões (Pria et al., 1999).

A medida de controle mais econômica e ecologicamente correta dessa doença é a utilização de cultivar resistente, entretanto a disponibilidade de cultivares resistentes nem sempre é possível devido ao fato de que existem várias raças fisiológicas do patógeno, o que representa obstáculo para a obtenção de novas cultivares de feijoeiro resistentes à antracnose (Rava et al., 1993). A ampla diversidade genética na população do patógeno presente nas diferentes zonas produtoras de feijão no Brasil faz que o uso de fungicidas seja amplamente empregado no controle da doença, o que, além de ter impacto negativo no ambiente, favorece o surgimento de populações resistentes do patógeno (Bassanezi et al., 2001).

Nesse contexto, a potencialização das defesas bioquímicas da planta mostra-se como alternativa para reduzir os danos causados pelos patógenos. Uma medida alternativa, com resultados já consolidados em alguns patossistemas, é a utilização do silício (Si). Trabalhos têm sido feitos, com sucesso, para o controle de doenças em gramíneas, principalmente no patossistema arroz-*Magnaphorthe grisea*. Pesquisas já elucidaram grande parte dos mecanismos potencializados por esse elemento que culminam na redução da doença. Para plantas dicotiledôneas e especificamente no patossistema feijoeiro x *C. lindemuthianum*, o nível de informação é ainda incipiente,

necessitando de pesquisas básicas para elucidar os mecanismos pelo qual o Si aumenta a resistência da planta. Entre os mecanismos de defesa, possivelmente potencializados pela aplicação do Si, estão a formação de barreira física abaixo da cutícula após a polimerização do ácido monossilício e o incremento na produção de compostos de defesa, como fenóis, fitoalexinas e enzimas líticas, assim como a transcrição de genes associados com a resistência (Kim et al., 2002; Rodrigues et al., 2005). O possível mecanismo de participação do molibdênio (Mo) no aumento da resistência às doenças ainda não está esclarecido, no entanto o requerimento de Mo pelas enzimas nitrogenase e redutase do nitrato é essencial para mediar e incrementar o metabolismo do nitrogênio (Marschner, 1986; Taiz e Geizer, 2004). Essa pode ser uma forte razão para se associar o Mo com a resposta das plantas às doenças.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. **Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) a infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Saa E Magn) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes.** 1988. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 1988.

BASSANEZI, R. B.; AMORIN, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; HAU, B.; BERGER, R. D. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathol.**, v. 50, p. 1-11, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMIENTO. **Acompanhamento da safra brasileira.** 2009. Disponível em: <<http://conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: fev. 25, 2009.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Goiânia, GO: Embrapa Cerrados; Planaltina, DF; Embrapa Trigo; Passo Fundo, RS, 2005. 82 p. ISSN 1516-7518. (Documentos 173).

FAO . Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2011. Disponível em: <<http://.fao.org>>. Acesso em: 5 mar. 2009.

KIM, S. G.; KIM, K. W.; PARK, E. W.; CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves, a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, v. 92, p.1095-1103, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** London, UK: Academic Press, 1986.

PRIA, M. D.; SILVA, O. C.; COSTA, J. L. S.; SOUZA, E. D. T.; BERNI, R. F. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro:** orientações para manejo econômico e ecológico In: CANTERI, M. G.; PRIA, M. D.; SILVA, O. C. (Eds.). Ponta Grossa, 1999. p. 17-34.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatol Bras.**, v. 18, p. 388-391.

RODRIGUES, F. A.; JURICK, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiol Mol Plant Pathol.**, v. 66, p. 144-159, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1998.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. 2nd ed. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1988.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE MEDIADA PELO SILÍCIO

RESUMO

Este estudo investigou o efeito do silício (Si) na resistência do feijoeiro à antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. Plantas de feijoeiro (cv. Pérola) foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) ácido monossilício. A concentração foliar de Si e o período de incubação aumentaram em 55,2 e 14,3%, respectivamente, nas plantas supridas com Si em relação às não supridas. A área abaixo da curva do progresso da antracnose e a severidade estimada pelo software QUANT decresceram significativamente em 32,9 e 27%, respectivamente, quando as plantas foram supridas com Si. O Si não teve efeito em aumentar a concentração de compostos fenólicos solúveis totais. A atividade de quitinases foi maior nos estádios mais avançados da infecção por *C. lindemuthianum* nas folhas das plantas supridas com Si. A atividade da β -1,3-glucanases aumentou após a infecção por *C. lindemuthianum*, mas não foi potencializada pelo Si. As atividades das peroxidases e polifenoloxidasas não tiveram efeito aparente na resistência do feijoeiro à antracnose, independentemente da presença do Si. O aumento na concentração da lignina e na atividade da fenilalanina amônia-liases e lipoxigenases foram importantes no aumento da resistência das plantas de feijoeiro supridas com Si à antracnose. Os resultados deste estudo permitiram a conclusão de que o Si pode aumentar a resistência do feijoeiro à antracnose por potencializar mecanismos bioquímicos de defesa do que apenas exercendo uma barreira mecânica que impede ou atrasa a penetração de *C. lindemuthianum*.

ABSTRACT

Physiological and Biochemical Analysis of Resistance to Bean Anthracnose Powered by the Silicon

This study investigated the effect of silicon (Si) in the resistance of bean plants to anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. Bean plants (cv. Pearl) were grown in nutrient solution containing (+ Si) or not (-Si) monosilicic acid. Leaf concentration of Si and the incubation period increased by 55.2 and 14.3%, respectively, in plants supplied with Si in relation to plants not supplied with Si. The area under anthracnose curve progress and severity estimated by the software QUANT significantly decreased by 32.9 and 27%, respectively, when plants were supplied with Si. Silicon did not affect increase concentration of total soluble phenolic compounds. Activity of chitinase was higher in advanced stages of infection by *C. lindemuthianum* in the leaves of plants Si-supplied. Activity of β -1,3-glucanases increased after infection with *C. lindemuthianum*, but it was not enhanced by Si. Activities of peroxidases and polyphenoloxidases had no apparent effect on resistance of bean plants to anthracnose, regardless of the presence of Si. The increase in lignin concentration and in the activity of phenylalanine ammonia-lyase and lipoxygenase were important for increasing the resistance of Si-supplied bean plants to anthracnose. The results of this study allowed the conclusion that Si can increase resistance to anthracnose in bean plants by enhancing biochemical mechanisms of defense than just acting as a physical barrier that prevents or delays penetration of *C. lindemuthianum*.

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib, é uma das doenças mais destrutivas que afetam a cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em regiões tropicais e subtropicais da América Latina e África Central e Oriental (Pastor-Corrales, 1985). Em tais áreas, perdas na produção podem atingir 100% quando são utilizadas sementes infectadas com o patógeno ou cultivares suscetíveis sob condições ambientais favoráveis ao progresso da antracnose (Peloso, 1992).

O patógeno acomete plantas de feijoeiro em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, caule, ramos, vagens e sementes (Araújo, 1988). Plantas jovens geralmente são mais suscetíveis ao ataque pelo patógeno do que as plantas adultas por possuírem tecidos menos lignificados. Os sintomas da antracnose podem aparecer em toda a parte aérea das plantas após a germinação das sementes infectadas (Vieira, 1988). Nas plântulas, observam-se lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo. As lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras (Peloso, 1992). Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escura ou pardas que atingem inicialmente as nervuras principais até as secundárias à medida que ocorre o progresso da doença (Pria et al., 1999). Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas, de tamanho variável e com o centro claro, sendo delimitadas por um anel negro, um pouco saliente, rodeado por uma borda de cor café avermelhada (Hall, 1991). Quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis, uma massa de conídios de coloração rosada é formada no centro das lesões (Pria et al., 1999).

O uso de cultivares resistentes é considerado a opção mais viável para o controle da antracnose, principalmente quando elas são utilizadas em cultivos em pequena escala (Singh et al., 1992; Vieira, 1988). No entanto, a existência de várias

raças fisiológicas do patógeno representa um obstáculo para a obtenção de novas cultivares de feijoeiro resistentes à antracnose (Rava et al., 1993). A aplicação de fungicidas também é uma medida de controle bastante utilizada pelos agricultores, mesmo levando em consideração o impacto negativo ao ambiente e a possibilidade do patógeno em desenvolver resistência. Diante dessas preocupações, faz-se necessário encontrar métodos alternativos de controle para diminuir as perdas ocasionadas por *C. lindemuthianum* na cultura do feijoeiro. O silício (Si), apesar de não ser considerado um nutriente essencial às plantas, destaca-se por diminuir a intensidade de doenças importantes em várias culturas, principalmente gramíneas e algumas dicotiledôneas como café, soja, pepino (Datnoff et al., 2007). Os mecanismos de resistência conferidos pelo Si ainda precisam ser mais bem elucidados. No patossistema arroz-*Pyricularia grisea*, o incremento da resistência das plantas pela aplicação de Si tem sido associado a um aumento na densidade de células silicatadas longas e curtas na epiderme foliar ou à existência de uma espessa camada de sílica abaixo da cutícula, formando uma barreira física que impede ou atrasa a penetração do fungo (Kim et al., 2004). Entre os mecanismos fisiológicos e ou bioquímicos potencializados pelo Si, tem-se constatado o incremento na produção de compostos fenólicos, fitoalexinas, enzimas relacionadas com a defesa como quitinases e β -1,3-glucanases e a transcrição de genes associados com a resistência da planta (Kim et al., 2002; Rodrigues et al., 2005; Liang et al., 2006).

Em dicotiledôneas, Menzies et al. (1992) observaram mudança na expressão da defesa de células da epiderme de pepineiro colonizadas por *Podosphaeria xanthii*. Compostos fenólicos acumularam-se de forma mais rápida nas células de plantas supridas com Si e infectadas pelo fungo do que nas células das plantas não supridas com esse elemento. As células das raízes de plantas de pepineiro infectadas por *Pythium ultimum* que receberam a aplicação de Si responderam, de forma mais rápida, à infecção através do acúmulo de compostos fenólicos (Chérif et al., 1992). Ao contrário da barreira física, os fenóis presentes exerceram efeito tóxico, impedindo o ingresso do patógeno no sistema vascular (Chérif et al., 1992). Em outro estudo, Chérif et al. (1994) observaram que a atividade das enzimas relacionadas com a patogênese, a exemplo de quitinases, peroxidases e polifenoloxidasas, tiveram aumento significativo em suas atividades em pepineiro suprido com Si e inoculadas com *P. ultimum*, ao contrário do que foi verificado em plantas inoculadas com o patógeno e não supridas com Si. A descoberta de que uma

nova classe de fitoalexina é induzida em pepineiro suprido com Si após a infecção por *P. xanthii* levou a crer que esse elemento potencializa uma cascada de eventos bioquímicos relacionados com a defesa das plantas (Fawe et al., 1998). No patossistema feijoeiro-*C. lindemuthianum*, o Si reduziu a área abaixo da curva do progresso da incidência e a área abaixo da curva do progresso da severidade da antracnose e contribuiu para a maior duração da área foliar sadia, em comparação com plantas não supridas com esse elemento (Moraes et al., 2006).

Para o patossistema feijoeiro-*C. lindemuthianum*, os trabalhos relativos ao emprego de Si são ainda incipientes e pouco conclusivos. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do Si em alguns componentes da resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum*, os mecanismos bioquímicos e a resistência possivelmente potencializados por esse elemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da solução nutritiva e crescimento das plantas de feijoeiro: a solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com Liao et al. (2001) e constituída de: 3 mMol L⁻¹ KNO₃; 2 mMol L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O; 0,5 mMol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,25 mMol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 mMol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 12,5 μMol L⁻¹ H₃BO₃; 1 μMol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 μMol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 μMol L⁻¹ EDTA bissódico. O Si, fornecido como ácido monossilício, foi obtido pela passagem do silicato de potássio através da resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, H⁺ forma, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (MA et al., 2002). As concentrações de Si utilizadas foram de 0 e 2 mMol L⁻¹, e a adição do ácido monossilício à solução nutritiva não alterou o pH.

Sementes de feijoeiro (cv. Pérola) foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% (vol/vol) e, posteriormente, lavadas em água estéril por 2 min e germinadas em papel-filtro embebido com água estéril por dois dias a 25 °C. As plântulas foram mantidas por dois dias em solução nutritiva meia força iônica sem adição de Si. Após esse período, as plântulas foram transferidas para novos vasos plásticos contendo 5 L de solução nutritiva com ou sem a presença de Si, sob aeração, até o final do experimento. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido a 5,5, empregando soluções de NaOH ou HCl (1 M), quando necessário.

Produção do inóculo de *C. lindemuthianum* e inoculação das plantas de feijoeiro: o isolado 81-538 da raça 81 de *C. lindemuthianum*, obtido da Micoteca do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia da UFV, foi

utilizado neste estudo. Ele foi preservado em tiras de papel-filtro dentro de tubos de vidro contendo sílica-gel a 4 °C. Pedacos de papel-filtro com micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para a produção do inóculo, discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo foram colocados na superfície de vagens de feijoeiro esterilizadas, cujas bases foram inseridas em meio ágar-água 3% (vol/vol) contido em tubos de ensaio (Pastor-Corrales, 1985). Esses tubos foram armazenados em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro por 10 dias. Após o crescimento micelial e a produção de acérvulos contendo conídios, adicionou-se água destilada aos tubos para obter a suspensão de conídios. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada para a concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios mL⁻¹ em hemacitômetro.

Plantas de feijoeiro no estágio V4 (Vieira, 1998) crescendo por 21 dias em solução nutritiva foram inoculadas, em ambas as faces das folhas, com a suspensão de conídios utilizando-se atomizador De Vilbiss nº 15. Gelatina 1% (peso/vol) foi adicionada à água estéril utilizada para preparar a suspensão de conídios para auxiliar na adesão dos conídios nas folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro a 20 ± 2 °C com umidade relativa de 90% e fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro, por 24 h. Após esse período, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 21 ± 2 °C, umidade relativa de $95 \pm 2\%$ e fotoperíodo de $225 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. As plantas foram mantidas nessa câmara até o término dos experimentos.

Avaliação do período de incubação (PI) e severidade da antracnose: os três trifólios da terceira folha das plantas de cada repetição e tratamento foram marcadas para realizar as avaliações do PI e da severidade. O PI, em horas, foi determinado observando-se o aparecimento dos primeiros sintomas da antracnose nas folhas marcadas a cada 4 h após a inoculação (hai). A severidade da antracnose nas folhas marcadas de cada planta foi avaliada às 24, 48, 72, 96 e 120 h, utilizando-se a escala diagramática de 0,1 a 24% da porcentagem de área folhar doente (Godoy et al., 1997). A área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) de cada folha por planta foi calculada por integração trapezoidal da curva do progresso da antracnose, de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1977). Após a

última avaliação da severidade, as folhas foram coletadas e digitalizadas na resolução de 400 dpi, e as imagens, processadas no software QUANT (Liberato, 2003) para obtenção da área foliar lesionada, a qual foi denominada severidade estimada pelo QUANT (SEQ).

Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG): amostras dos três folíolos da terceira folha das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 120 e 144 h. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum* (0 h) serviram como controle. As amostras foram coletadas em nitrogênio (N₂) líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até a análise. Uma amostra representativa de 0,1 g de tecido foliar por repetição, de cada tratamento, foi macerada em almofariz e pistilo contendo N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga e homogeneizado com 1,5 mL de metanol 80%. O extrato permaneceu por 12 h em mesa agitadora a 200 rpm em temperatura ambiente. O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o sobrenadante, transferido para um novo tubo de microcentrífuga e usado para a determinação da concentração de CFST. O resíduo foi mantido a -20 °C para determinação dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. O método desenvolvido por Zieslin e Ben-Zaken (1993) com algumas modificações foi usado para determinar a concentração de CFST. Um volume de 150 µL do reagente Fenol Folin-Ciocalteu 0,25 N (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi adicionado a 150 µL do extrato metanólico e mantido à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 150 µL de carbonato de sódio (1 M) foram adicionados à mistura, seguida de agitação e mantida em temperatura ambiente por 10 min. Logo após, 1 mL de água destilada foi adicionado à mistura, homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 1 h. Determinou-se a absorbância da mistura em uma amostra de 500 µL de cada repetição em cada tratamento a 725 nm, em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de CFST foi expressa em µg de compostos fenólicos (em termos de catecol) por g de tecido foliar. Durante todo o processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel-alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz.

Um volume de 1,5 mL de água estéril destilada foi adicionado ao resíduo obtido após a extração dos CFST. depois da homogeneização, a mistura foi

centrifugada a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo, seco por 12 h a 65 °C. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi usado para determinar lignina de acordo com o método de Barber e Ride (1988). Um volume de 1,5 mL da solução ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e HCl a 2 N (1:10) foi adicionado ao resíduo seco. Os tubos de microcentrífuga foram levemente agitados para hidratar o resíduo e depois colocados em banho-maria a 100 °C por 4 h. Posteriormente, os tubos de microcentrífuga foram colocados em gelo (4 °C) por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada esterilizada e centrifugado novamente a 10.000 g por 10 min. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso em 1,5 mL de NaOH a 0,5 N. A mistura permaneceu por 12 h em mesa agitadora na velocidade de 150 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante, transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de HCl concentrado ao sobrenadante, sendo os tubos de microcentrífuga transferidos para geladeira (4 °C) por 4 h, para precipitação dos derivados da LATG. Uma nova centrifugação a 10.000 g por 10 min foi realizada, o sobrenadante descartado e o precipitado (castanho-alaranjado) dissolvido em 2 mL de NaOH a 0,5 N. A absorbância dos derivados da LATG no sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 280 nm (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e a concentração, expressa em µg g⁻¹ de tecido foliar. A lignina alcalina éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi usada como padrão.

Determinação da atividade de peroxidases (POX, EC1.11.1.7), polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1), fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5), quitinasas (QUI, 3.2.1.14), β-1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12): amostras dos três folíolos da terceira folha das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 96 e 120 hai. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum* serviram como controle (0 hai). As amostras foram armazenadas individualmente em papel-alumínio, rapidamente congeladas em N₂ líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Para obtenção dos extratos usados na determinação da atividade das enzimas POX e PPO, 0,4 g de tecido foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 2% (p/v) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante, usado para as determinações enzimáticas. A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia de Kar e Miashra (1976). Uma mistura de 950 µL de água destilada, 750 µL de 100 mM tampão-fosfato de potássio (pH 6,8), 600 µL de 100 mM pirogalol e 600 µL de 100 mM de peróxido de hidrogênio foi adicionada a 100 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm, em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a cada 10 s, durante 1 min após a adição do extrato à mistura, totalizando cinco leituras. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da POX (Chance; Maehley, 1955), a qual foi expressa em mmol de purpurogalina produzida por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Durante todo o processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel-alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz. A atividade da PPO foi determinada à semelhança da POX, exceto o fato de que o peróxido de hidrogênio não foi usado na mistura.

Para a obtenção do extrato usado na determinação da atividade da FAL, 0,5 g de tecido foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz com a adição de PVP (2%) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão borato de sódio 0,05 M (pH 8,3) contendo 5 mM β-mercaptoetanol e 1 mM EDTA. A mistura foi centrifugada duas vezes a 7.000 g por 15 min. O sobrenadante foi usado como substrato para determinar a atividade da FAL. A reação foi iniciada após a adição de 0,5 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de tampão borato de sódio (pH 8,8; 0,1 M) e 1 mL de 20 mM de *L*-fenilalanina. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C, durante 1 h. Nas amostras-controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão borato de sódio. A reação foi finalizada pela adição de 0,1 mL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm, e o coeficiente de extinção molar de 10⁴ mM⁻¹ cm⁻¹ (Zucker, 1965) foi usado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em mmol h⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Para obter os extratos usados nas determinações das atividades da QUI e GLU, 0,3 g de tecido foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz, com a adição de PVP (2%) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão-fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de PMSF. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante, empregado como extrato para as determinações enzimáticas. A atividade da QUI foi determinada pelo método de Robert e Selitrennikoff (1988) modificado por Harman et al. (1993). A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 470 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 10 µL do substrato *p*-nitrofenil-β-D-N-N'-diacetilquitobiose (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 2 mg mL⁻¹. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h. A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de 0,2 M de carbonato de sódio. Nas amostras-controle, apenas o carbonato de sódio foi adicionado depois da adição do extrato à mistura de reação, e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 2 h. A absorbância do produto final liberado pela quitinase foi determinada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de 7×10^4 mM cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da QUI, a qual foi expressa em µmol de *p*-nitrofenil produzido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade da GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972). A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 230 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µL do substrato laminarina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 4 mg mL⁻¹. A mistura da reação foi incubada em banho-maria por 30 min a 45 °C. Após o período de incubação, determinou-se a quantidade de açúcares redutores através da adição de 250 µL de DNS (ácido dinitrossalicílico) à mistura e, em seguida, da sua incubação em banho-maria por 15 min a 100 °C. A reação foi interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30 °C. Nas amostras-controle, a mistura de reação foi igual, exceto o fato de que o extrato vegetal foi adicionado após o aquecimento da mistura a 100 °C. A absorbância do produto liberado pela GLU foi medida a 540 nm e a atividade da GLU, expressa em unidades de absorbância min⁻¹mg⁻¹ de proteína.

Para obtenção do extrato para determinação enzimática da LOX, 0,2 g de tecido foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz com a adição de PVP até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo 1 mM de PMSF e 0,1 mM EDTA e 2% de

PVP. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado como extrato para determinação da atividade da LOX. A reação foi iniciada após adição de 0,3 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de tampão-fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 0,3 µL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A mistura foi incubada em banho-maria por 4 min a 25 °C. A atividade da LOX foi determinada conforme a metodologia descrita por Axelrod et al. (1981). A absorbância do produto liberado pela LOX foi medida em espectrofotômetro a 234 nm. O coeficiente de extinção molar de 25.000 M⁻¹ cm⁻¹ foi usado para determinar a atividade da LOX, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

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

Delineamento experimental e análise estatística dos dados: dois experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (-Si e +Si) e seis repetições, para avaliação do PI e da severidade da antracnose. Os dados do PI, AACPA e SEQ dos dois experimentos foram combinados após a determinação da homogeneidade de variância pelo teste de Cochran (Gomez e Gomez, 1994). Apenas um experimento foi realizado para as avaliações bioquímicas. Os dados da concentração de CFST, derivados da LATG e das atividades da POX, PPO, FAL, QUI, GLU e LOX, foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste-t ($P \leq 0,05$), utilizando-se o software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Cada unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo 5 L de solução nutritiva e três plantas de feijoeiro. A concentração foliar de Si foi correlacionada com o PI, AACPA e SEQ.

RESULTADOS

Concentração foliar de Si: a concentração foliar de Si foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) nas plantas supridas com Si com incremento de 55,2% em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1).

Avaliação do PI, AACPA e SEQ: houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) para o PI, AACPA e SEQ entre os tratamentos -Si e +Si (Tabela 1). O PI foi significativamente maior nas folhas das plantas de feijoeiro supridas com Si com aumento de 14,34% em comparação com as plantas não supridas com esse elemento. A AACPA e a SEQ decresceram significativamente ($P \leq 0,05$) em 33 e 27%, respectivamente, nas folhas das plantas supridas com Si em relação às folhas das plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração foliar de silício (Si), período de incubação (PI), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) e severidade estimada pelo software QUANT (SEQ) em plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*

Tratamentos	Si (dag/kg)	PI (h)	AACPA	SEQ(%)
-Si	0,74	78,92	60,05	6,91
+Si	1,15	92,13	40,28	5,04
Valor de F	17,81*	15,13*	15,53*	13,86*
C.V. (%)	17,76	7,61	17,31	14,54

*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste-t. C.V. = Coeficiente de Variação.

Concentração de CFST e derivados da LATG: a concentração de CFST foi maior nas folhas das plantas não supridas com Si, das 36 às 72 hai, seguidas de decréscimo às 96 hai e posterior aumento às 120 hai (Fig. 1). A concentração de CFST foi maior nas folhas das plantas supridas com Si somente às 96 e 120 hai. Diferenças

significativas entre os tratamentos -Si e +Si ocorreram apenas às 36, 48, 96 e 120 hai. A concentração de derivados da LATG foi significativamente maior nas folhas das plantas supridas com Si às 48 e 96 hai, em comparação com a concentração encontrada nas folhas das plantas não supridas com Si (Fig. 2). Às 120 hai, a concentração de derivados da LATG foi significativamente maior nas folhas das plantas não supridas com Si, em comparação com as folhas das plantas supridas com Si (Fig.2).

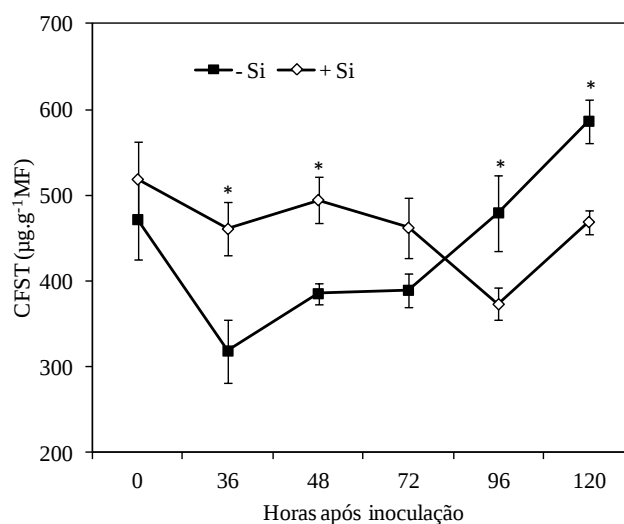


Figura 1 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

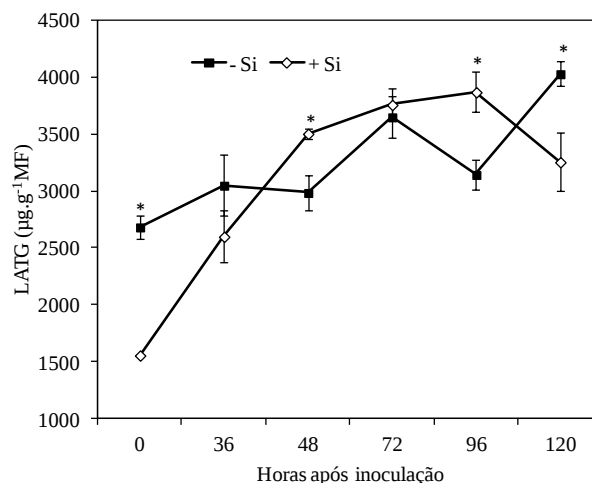


Figura 2 - Concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol de silício L^{-1} (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

Atividade das enzimas POX, PPO, FAL, QUI, GLU e LOX: a atividade da POX foi significativamente maior às 72 hai, nas folhas das plantas não supridas com Si (Figura 3). Diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu somente às 72 hai.

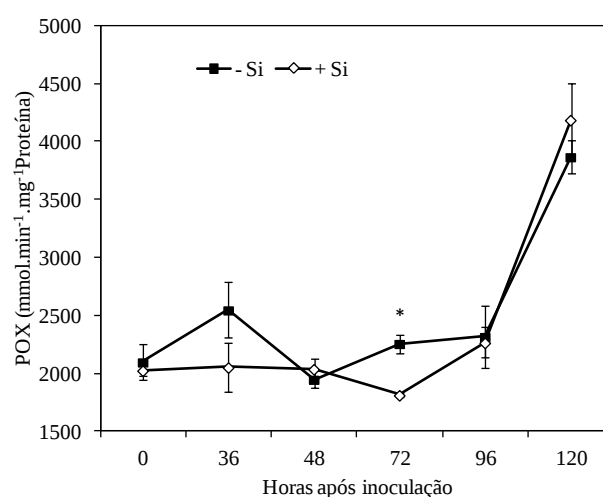


Figura 3 - Atividade de peroxidases (POX) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L^{-1} (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

A atividade da PPO mostrou-se similar entre os tratamentos -Si e +Si das 0 às 72 hai (Fig. 4). Às 96 hai, a atividade da PPO foi significativamente maior nas folhas das plantas não supridas com Si, em comparação com as folhas das plantas supridas com esse elemento. A atividade da FAL mostrou-se superior no tratamento +Si às 36, 48, 96 e 120 hai, porém diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu somente às 120 hai (Fig. 5). A atividade da QUI decresceu após a inoculação das plantas não supridas com Si até as 72 hai, seguido de aumento até as 120 hai (Fig. 6). Nas plantas supridas com Si, a atividade da QUI aumentou até as 48 hai, seguido de decréscimo até as 96 hai, com pico às 120 hai (Fig. 6). Diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu apenas às 36, 72 e 120 hai. A atividade da GLU aumentou após a infecção por *C. lindemuthianum*, independentemente da presença do Si (Fig. 7), e mostrou-se maior nas folhas das plantas não supridas com Si das 48 às 120 hai, porém diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu somente às 72 hai. A atividade da LOX decresceu após a infecção por *C. lindemuthianum*, seguido de aumento a partir das 36 hai nas folhas das plantas não supridas com Si (Fig. 8). Nas folhas das plantas supridas com Si, a atividade da LOX aumentou até as 48 hai, decresceu às 72 hai, seguido de aumento às 96 hai, com posterior decréscimo às 120 hai. A atividade da LOX foi significativamente maior nas folhas das plantas supridas com Si às 48 e 96 hai, em comparação com a atividade encontrada nas folhas das plantas não supridas com Si (Fig. 8).

Correlação de Pearson: houve correlação positiva e significativa entre a concentração foliar de Si e o PI ($r = 0,73$, $P < 0,05$). A AACPA e a SEQ correlacionaram-se negativa e significativamente com a concentração foliar de Si ($r = -0,64$ e $-0,74$, respectivamente; $P < 0,05$).

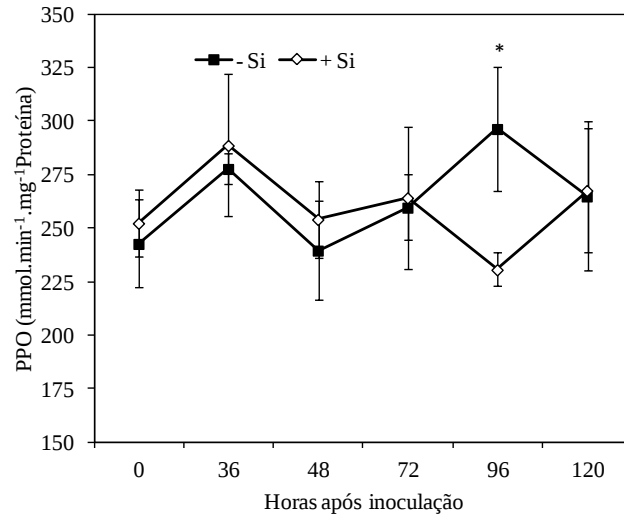


Figura 4 - Atividade de polifenoloxidasas (PPO) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

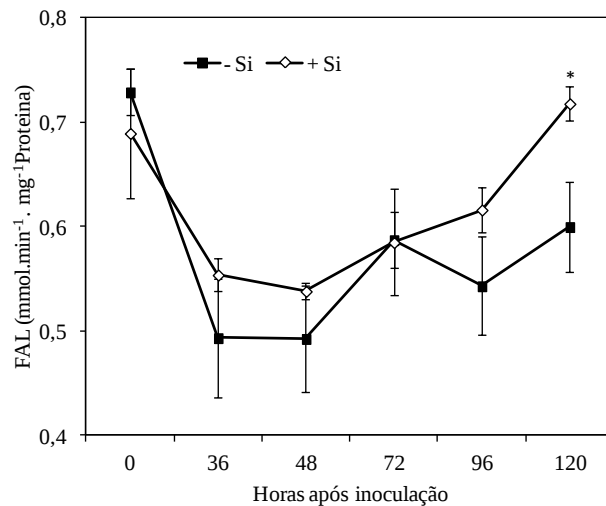


Figura 5 - Atividade de fenilalanina amônia-liases (FAL) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

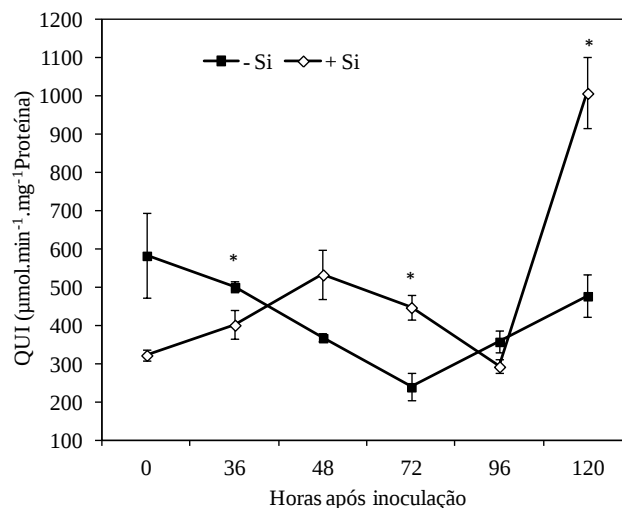


Figura 6 - Atividade de quitinases (QUI) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

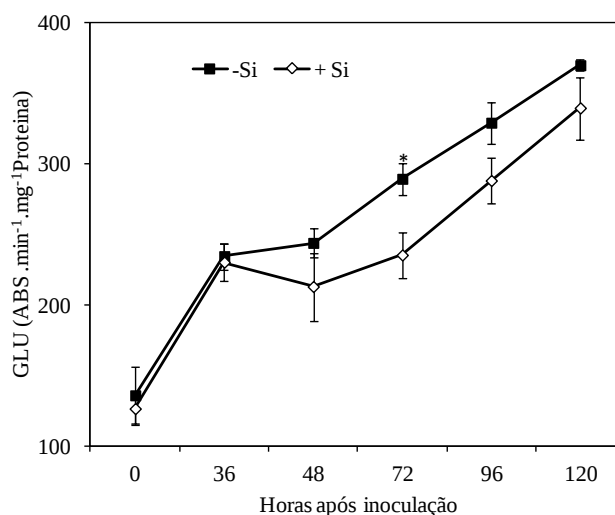


Figura 7 - Atividade de β -1,3-glucanases (GLU) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

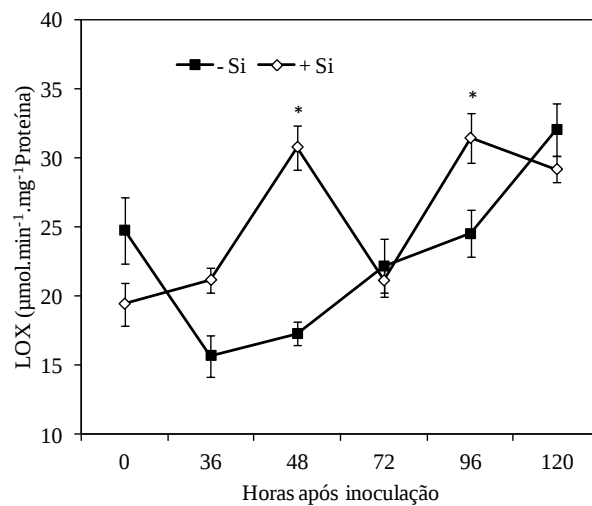


Figura 8 - Atividade de lipoxigenases (LOX) em folhas de feijoeiro crescido em solução nutritiva com 0 (-Si) ou 2 mmol silício L⁻¹ (+Si) em diferentes intervalos após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o desvio-padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por um asterisco (*) diferem pelo teste-t a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos do Si, diretos ou indiretos, em plantas submetidas aos diferentes tipos de estresses bióticos e, ou, abióticos têm sido relatados para várias espécies de plantas (Datnoff et al., 2007). Doenças de importância econômica em culturas como arroz, centeio, cevada, morango, milho, pepino, soja, sorgo e trigo foram eficientemente controladas pelo fornecimento de Si (Bélanger et al., 2003; Datnoff et al., 2007; Dallagnol et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). No patossistema feijoeiro-*C. lindemuthianum*, ainda não foi estudado o possível efeito do Si em reduzir a intensidade da doença. Assim, este estudo procurou preencher essa lacuna, fornecendo informações sobre como o Si afeta o processo infeccioso de *C. lindemuthianum* nas folhas de feijoeiro.

A concentração foliar de Si em plantas supridas com esse elemento foi de até 1,2%, o que correspondeu a um valor próximo ao encontrado em dicotiledôneas, que acumulam cerca de 1% de Si na matéria seca da parte aérea (Liang et al., 2006). Porém, essa concentração foi inferior à verificada em arroz, cana-de-açúcar e outras gramíneas reconhecidas como acumuladoras de Si, as quais chegam a apresentar até 5% de Si na matéria seca da parte aérea (Datnoff et al., 2007; Dallagnol et al., 2009). Em arroz, sabe-se que a presença de duas proteínas produzidas pelos genes *Lsi1* e *Lsi2* são responsáveis pelo transporte ativo do ácido monossilícico na exoderme e na endoderme das raízes laterais (Ma et al., 2006, 2007), além da proteína produzida pelo gene *Lsi6* responsável pela translocação do ácido monossilícico do xilema para o interior das células do parênquima foliar (Yamaji et al., 2008).

O Si contribuiu para aumentar o PI da antracnose. Quanto maior o PI, menor será a taxa de progresso da doença (r), diminuindo, assim, o número de ciclos secundários dos patógenos de plantas (Parlevliet, 1979; Zadoks, 1971). O Si contribuiu para reduzir também a AACPA, a qual expressa informações quantitativas

do efeito da resistência do hospedeiro em diminuir a intensidade da doença (Jeger e Rollinson, 2001). Apesar de os melhoristas terem desenvolvido várias cultivares de feijoeiro com resistência à antracnose (Rava et al., 1993), essas precisam ser continuamente obtidas devido à grande variabilidade genética que ocorre na população do patógeno (Bassanezi et al., 2001). Em outros patossistemas, onde as plantas exibem resistência vertical, como é o caso da interação arroz-*P. grisea*, Rodrigues et al. (2005) observaram que em plantas da cultivar Katy que apresentaram resistência vertical, o Si não teve nenhum efeito na resistência da planta ao patógeno, o que ocorreu somente na interação compatível com a cultivar M-201. Esse resultado sugere que o Si tem ativa participação no incremento da resistência em uma interação diferente da controlada por genes relacionados com a resistência vertical. De forma similar, diferentes doses de Si tiveram efeito no aumento do PI e diminuição na severidade da antracnose em uma cultivar suscetível de sorgo, o que não foi observado na cultivar altamente resistente (Resende et al., 2009).

Um dos mecanismos envolvidos no aumento da resistência do arroz à *P. grisea* relaciona-se com maior deposição e polimerização do Si abaixo da cutícula, formando uma camada dupla cutícula-sílica que impede ou atrasa a penetração do patógeno (Yoshida, 1962; Kim et al., 2002). Estudos mais aprofundados demonstraram que plantas de arroz supridas com Si aumentaram rapidamente a produção de compostos fenólicos e duas fitoalexinas de classes dos terpenoides em associação com maior ativação dos genes da peroxidase e PR-1 em resposta à infecção por *P. grisea* (Rodrigues et al., 2003, 2004, 2005). Neste estudo, postula-se a hipótese de que o aumento do PI e a redução na AACPA nas plantas supridas com Si podem ter sido devidos à maior deposição do Si abaixo da cutícula em associação com uma rápida e intensa ativação dos mecanismos de defesa no hospedeiro. No caso das dicotiledôneas como o pepineiro, acredita-se que o Si solúvel esteja induzindo resistência, como poderia estar envolvido na rápida acumulação de proteínas relacionadas com a patogênese ou na produção de fitoalexinas (Fawe et al., 1998).

Os compostos fenólicos afetam o processo infeccioso de vários patógenos, através de diferentes mecanismos que envolvem a inibição de enzimas fúngicas extracelulares, como celulases, pectinases, lacases e xilanases; a inibição da fosforilação oxidativa fúngica; a privação de nutrientes (complexação de metais e

insolubilização de proteínas) e atividade antioxidante nos tecidos das plantas (Jersh et al., 1989; Scalbert, 1991). As propriedades lipofílicas e a presença de um grupo hidroxila nos compostos fenólicos parecem desempenhar papel importante em sua atividade antifúngica, permitindo a penetração nas membranas e o desacoplamento da fosforilação oxidativa e causando aumento na permeabilidade da membrana, extravasamento do conteúdo celular e agregação citoplasmática (Southerton; Deverall, 1990; Weete, 1980). Alguns estudos relatam como a aplicação de Si pode afetar a produção dos compostos fenólicos em plantas sob ataque dos patógenos (Carver et al., 1998; Rodrigues et al., 2005). Neste estudo, o Si teve efeito variável na concentração de CFST. A redução na concentração de CFST pode ser explicada pelo aumento na atividade da FAL, o que culmina com a maior produção de lignina. A biossíntese de lignina começa no citoplasma da planta com a síntese de monolignol glicosilado a partir do aminoácido fenilalanina (Campbell e Sederoff, 1996). A lignina é covalentemente ligada à hemicelulose por ligações com os diferentes polissacarídeos das plantas, conferindo, assim, resistência mecânica à parede celular e afetando a difusão de várias enzimas líticas produzidas pelos patógenos durante a colonização do tecido do hospedeiro (Chabannes et al., 2001). Desse modo, o Si poderia estar associado à lignificação da parede celular e não à produção de compostos fenólicos. O aumento na concentração dos derivados da LATG durante o início da infecção esteve diretamente associado com o incremento na resistência das plantas supridas com Si.

A atividade da FAL aumentou na presença de Si, sugerindo que a rota dos fenilpropanoides possa ter papel importante na resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum*. A FAL promoveu a primeira etapa enzimática que converte a *L*-fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico e, posteriormente, a síntese de grande número de compostos fenólicos e fitoalexinas (Campbell e Sederoff, 1996). Em arroz, Rodrigues et al. (2003) reportaram que plantas supridas com Si produziram maior quantidade de fitoalexinas momilactonas em resposta à infecção por *P. grisea* que as plantas não supridas com Si.

As enzimas hidrolíticas quitinases e β -1,3-glucanases são induzidas por patógenos ou produtos químicos exógenos (Chet, 1993; Kim e Hwang, 1994) e catalisam a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos, como a quitina e a β -1,3-glucano. Após a infecção por patógenos, ocorre um pronunciado aumento na atividade dessas enzimas, o que ocasiona redução no crescimento dos

fungos e a liberação de oligossacarídeos elicitores que induzem a produção de fitoalexinas (Keen e Yoshikawa, 1983; Hartleb et al., 1997). A atividade da QUI foi maior nas folhas das plantas supridas com Si, o que pode ter afetado a colonização dos tecidos por *C. lindemuthianum*. Estudos envolvendo a resistência sistêmica adquirida à *C. lindemuthianum* com o uso de indutores abióticos mostram maior atividade da GLU do que da QUI (Kunh e Pascholati, 2010; Campos et al., 2009). Neste estudo, houve aumento na atividade da GLU após a infecção, mas sem nenhum efeito do Si em maximizar a atividade dessa enzima.

A maior indução da LOX indicou a participação dessa enzima em aumentar a resistência do feijoeiro à antracnose na presença do Si. As LOX são enzimas que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados, produzindo hidroperóxidos de ácidos graxos, os quais são metabolizados para formar aldeídos e ácido jasmônico (Croft et al., 1993). De acordo com Gunes et al. (2007), plantas de cevada crescendo em solo com altos níveis de sódio e boro e na presença de Si apresentam maior atividade da POX. As POX estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa, catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, e também com o aumento na síntese de lignina, que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997). As PPO catalisam a hidroxilação de monofenóis, formando ortodifenóis; e também a oxidação de ortodifenóis, formando ortoquinonas, as quais exibem natureza antimicrobiana superior à dos compostos fenólicos que as precedem (Rodrigues et al., 2005). Neste estudo, as atividades da POX e PPO não foram responsivas ao Si.

Os métodos utilizados para protegerem culturas economicamente importantes como o feijoeiro contra patógenos como *C. lindemuthianum* concentram-se, principalmente, no uso da resistência genética. Novas estratégias precisam ser desenvolvidas considerando a alta variabilidade genética na população do patógeno. Assim, os resultados deste estudo permitem concluir que a aplicação de Si aumenta a resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum*, afetando alguns componentes de resistência do hospedeiro em associação com maior produção de lignina e atividade das enzimas QUI, FAL e LOX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adatia MH, Besford RT. (1986) The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Ann Bot* **58**:343-35.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laasko S. (1981). Lipoxygenases from soybeans. *Meth Enzymol* **71**:441-451.
- Araújo E. (1988) Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) a infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Saa E Magn) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- Barber MS, Ride JP. (1998) A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol Mol Plant Pathol* **32**:185-197.
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Hau B, Berger DB. (2001) Accounting for photosynthetic efficiency of leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. *Plant Pathol* **50**:443-452.
- Bélanger RR, Bowen PA, Ehret DL, Menzies JG. (1995) Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Dis* **79**:329-336.
- Bélanger RR, Benhamou N, Menzies JG. (2003) Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology* **93**:402-412.
- Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Campbell MM, Sederoff RR. (1996) Variation in lignin content and composition. *Plant Physiol* **110**:3-13.

Campos AD, Hampe MMV, Ferreira AG, Antunes IF, Castro LA. (2009) Indução de resistência à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Pesqui Agropecu Bras* **44**:15-21.

Carver TLW, Robbins MP, Thomas BJ, Troth K, Raistrick N, Zeyen RJ. (1998) Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **52**:245-257.

Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A. (2001) *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* **28**:271-82.

Chance B, Maehley AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzymol* **2**:764-775.

Cherif M, Menzies J, Benhamou N, Bélanger RR. (1992) Studies of silicon distribution in wounded and *Phytophthora ultimum* infected cucumber plants. *Physiol Mo. Plant Pathol* **41**:371-385.

Chérif M, Asselin A, Bélanger RR. (1994) Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* **84**:236-242.

Croft KPC, Jüntter F, Slusarenko AJ. (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101**:13-24.

Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW. (2007) Silicon and plant disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 233-246.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* **99**:116-121.

Fawe A, Abou-Zaid M, Menzies JG, Bélanger RR. (1998) Silicon mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* **88**:396-401.

Godoy CV, Carneiro SM, Lamauti MT, Pria MD, Amorim L, Berger RD, Filho AB. (1997) Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **104**:336-345.

Gomez, KA, Gomez AA. (1994) *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd Ed. New York, USA, Wiley.

Gunes A, Inal I, Gagci EG, Coban S. (2007) Silicon-mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. *J Plant Physiol* **164**:807-811.

Hall R. (1991) Compendium of Bean Diseases. The American Phytopathological Society, APS Press, St Paul, MN.

Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Pietro AD, Peterbauer C, Tronsmo A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* **83**:313-318.

Hartleb H; Heitefuss R; Hoppe H. (1997) Resistance of crop plants against fungi. Germany: Fischer.

Jersh S, Scherer C, Huth G, Schlosser E. (1989) Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry. *J Plant Pathol* **22**:67-70.

Jeger MJ, Viljanen-Rollinson SLH. (2001) The use of the area under the disease progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* **102**:32-40.

Kar M, Miashra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* **57**:315-319.

Keen, NT; Yoshikawa M. (1983) β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol* **71**:460-465.

Kim SG, Kim KW, Park EW, Choi D. (2004) Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology* **92**:1095-1103.

Kim YJ, Hwang BK. (1994) Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Plant Physiol* **45**:195-209.

Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) *Análise de silício: solo, planta e fertilizante*. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 24 pp.

Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF. (1997) Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol* **114**:1237-1245.

Kuhn OJ, Pascholati SF. (2010) Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus*. *Summa Phytopathol* **36**:107-114.

Ma JF, Tamai K, Ichi M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiol* 130:2111-2117.

Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* **440**:688-691.

Ma FJ, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* **448**:209-213.

Menzies J, Bowen P, Ehret DL, Glass ADM. (1992) Foliar application of potassium silicate reduce severity of powdery on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. *J Am Soc Hortic* **117**:902-905.

Miyake Y, Takahashi E. (1983) Effect of silicon on the growth of solution cultured cucumber plants. *Soil Sci Plant Nutr* **29**:71-83.

Moraes SR, Pozza EA, Alves E, Pozza AA, Carvalho JC, Lima PH, Botelho AO. (2006) Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. *Fitopatol Bras* **31**:283-291.

Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal Biochem* **47**:273-279.

Liang YC, Hua HX, Zhu YG, Zhang J, Cheng CM, Romheld V. (2006) Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. *New Phytol* **172**:63-72.

Liao H, Yan X, Rubio G, Beebe SE, Blair MW, Lynch JP.(2004).Genetic mapping of basal root acquisition efficiency in common bean. *Funct Plant Biol* 31:959-970.

Liberato JR. (2003) Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.

Parlevliet JE. (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu Rev Phytopathol* **17**:203-222.

Pastor-Corrales M. (1985) Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: López Fernández F, Schoonhoven A. (eds) FRIJOL: Investigación y Producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 172-180.

Peloso MJ. (1992) Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: Pastor-Corrales (ed) La antracnosis del Frijol Común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina Doc. de trabajo 113. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 86-108.

Pria MD, Silva OC, Costa JLS, Souza EDT, Berni RF. (1999) Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico In: Canteri MG, Pria MD, Silva OC (eds). Ponta Grossa, pp.17-34.

- Rava CA, Molina J, Kauffmann M, Briones I. (1993) Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. *Fitopatol Bras* **18**:388-391.
- Resende RR, Rodrigues FA, Soares JM, Casela CR. (2009) Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *Eur J Plant Pathol* **124**:533-541.
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Bélanger RR. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon mediated rice blast resistance. *Phytopathology* **93**:535-46.
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* **94**:177-83.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA. (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* **66**:144-159.
- Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndörfer GH. (2009) Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australas Plant Pathol* **38**:366-372.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP. (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol* **134**:169-176.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**:3875-3883.
- Shaner G, Finney RE. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* **67**:1051-1056.
- Singh SP, Pastor-Corrales M, Molina A, Otoyá M. (1992). Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: La Antracnosis del Frijol Común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Doc. de trabajo 113. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 198-211.
- Southerton SG, Deverall BJ. (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Physiol Mol Pathol* **36**:483-494.
- Stumpf MA, Heath MC. (1985) Cytological studies of the interaction between the cowpea rust fungus and silicon-depleted French bean plants. *Physiol Plant Pathol* **27**:369-385.
- Vieira C. (1988) Doenças e Pragas do Feijoeiro. 2nd. Ed. Viçosa. MG. Imprensa Universitária.

Weete ER. (1980) Lipid Biochemistry of Fungi and other Organisms, New York. Plenum Press. 388 pp.

Yamaji N, Mitatni N, Ma JF. (2008) A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell* **20**:1381-1389.

Yoshida S, Ohinishi Y, Kitagishi K. (1962) Chemical forms, mobility, and deposition of silicon in the rice plant. *Jpn J Soil Sci Plant Nutr* **8**:107-111.

Zadoks JC. (1971) System analysis an the dynamic of epidemics. *Phytopathology* **61**:600-610.

Zieslin N, Ben-Zaken R. (1993) Peroxidase activity and presence of phenolic substances in penduncles of rose flowers. *Plant Physiol Biochem* **31**:333-339.

Zucker M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol* **40**:779-784.

CAPÍTULO 2

**FOTOSSÍNTESE E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO SUPRIDAS COM
SILÍCIO E INFECTADAS POR *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM***

RESUMO

Este estudo investigou o efeito do silício (Si) nas trocas gasosas e no alívio do estresse oxidativo em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum*. As plantas foram crescidas em solução nutritiva com ou sem a adição de ácido monossilícico. A concentração foliar de Si aumentou significativamente em 52,4%, e a severidade da antracnose decresceu muito em 34% na presença de Si na solução nutritiva. A taxa de assimilação líquida do carbono ($A_{máx}$) incrementou em 58,2%, e a condutância estomática (g_s) e a relação taxa de concentração de CO₂ interna vs. ambiente (C_i/C_a) diminuíram em 40 e 26,8% nas plantas supridas com Si em relação às não supridas com esse elemento, indicando maior inibição metabólica na fixação do CO₂. As concentrações de clorofilas *a* e *b* e carotenoides aumentaram na presença do Si, indicando maior eficiência fotorreceptora e fotoproteção do sistema fotossintético. Nas plantas supridas com Si e infectadas por *C. lindemuthianum*, houve aumento na atividade das enzimas ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase, mas não da catalase, além do decréscimo na concentração de peróxido de hidrogênio. Os resultados deste trabalho sugerem que o Si pode estar envolvido nas atividades metabólicas e, ou, fisiológicas das plantas de feijoeiro quando infectadas por *C. lindemuthianum*, com a manutenção da fotossíntese, e na produção de pigmentos.

ABSTRACT

Photosynthesis and activity of enzymes in the metabolism of oxidative stress in bean plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum lindemuthianum*

This study investigated the effect of silicon (Si) in gas exchange and the alleviation of oxidative stress in bean plants (cv. Pearl) infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. Plants were grown in nutrient solution with or without the addition of monosilicic acid.

Leaf concentration of Si increased significantly by 52.4%, and severity of anthracnose decreased by 34% in the presence of Si in the nutrient solution. The rate of net carbon assimilation ($A_{\max}$) increased by 58.2%, and stomatal conductance (g_s) and rate intern CO_2 concentration vs. environment CO_2 concentration relationship (C_i / C_e) decreased by 40 and 26.8% in plants supplied with Si in comparison to the plants not supplied with this element, indicating greater metabolic inhibition in CO_2 fixation. The concentrations of chlorophyll *a* and *b* and carotenoids increased in the presence of Si, indicating greater photoreceptor efficiency and photoprotection of the photosynthetic system. In plants supplied with Si and infected by *C. lindemuthianum*, there was an increase in the activity of enzymes ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and glutathione reductase but not catalase, in addition to the decrease in the concentration of hydrogen peroxide. The results of this study suggest that Si may be involved in metabolic activities and, or, physiological activities of bean plants when infected by *C. lindemuthianum*, with the maintenance of photosynthesis, and pigment production.

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemutianum* (Sacc. & Magn.) Scrib, é uma das principais doenças causadoras de redução na produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em áreas tropicais e subtropicais da América Latina e África Central e Oriental (Pastor-Corrales, 1985). Perdas de até 100% podem ocorrer quando sementes infectadas pelo patógeno são semeadas em áreas com condições climáticas favoráveis para o progresso da antracnose (Peloso, 1992).

Lesões necróticas de cor marrom-escuro a preta aparecem nos pecíolos e nas nervuras (Hall, 1991). A antracnose ocorre com mais frequência nas vagens, onde as lesões são de forma arredondada, deprimidas, de tamanho variável e com o centro claro, sendo delimitadas por um anel negro, pouco saliente, rodeado por uma borda de cor café avermelhada (Hall, 1991). Quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis, forma-se no centro das lesões uma massa de conídios de coloração rosada (Pria et al., 1999).

O uso de cultivares resistentes e a aplicação de fungicidas são as opções mais viáveis para o controle da antracnose (Singh et al., 1992). No entanto, a existência de várias raças fisiológicas do patógeno representa obstáculo para a obtenção de novas cultivares de feijoeiro resistentes a essa doença (Rava et al., 1993). O uso de fungicidas, além de ter impacto negativo no ambiente, favorece o surgimento de populações resistentes do patógeno (Bassanezi et al., 2001).

Embora o silício (Si) não seja considerado elemento essencial (Epstein, 1999), seu uso traz inúmeros benefícios às plantas quando submetidas a condições de estresses bióticos e, ou, abióticos (Datnoff et al., 2007). No caso dos estresses de natureza abiótica, sua aplicação tem contribuído para aumentar a tolerância das plantas à deficiência de água, estresse salino e toxidez por metais pesados (Zhun et al., 2004; Hattori et al., 2005; Gunes et al., 2007). Também está amplamente

documentada na literatura a associação do Si com o estresse biótico, potencializando mecanismos de defesa das plantas quando infectadas por patógenos (Datnoff et al., 2007).

Características fotossintéticas como as trocas gasosas e os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* são consideradas indicadoras eficientes do comportamento do aparato fotossintético quando as plantas são submetidas ao ataque de patógenos (Baker e Rosenqvist, 2004; Berger et al., 2007). Plantas infectadas por fungos, bactérias e vírus usualmente exibem redução na taxa fotossintética (Berger et al., 2007). Anormalidades na forma e função dos cloroplastos nos tecidos doentes normalmente estão associadas à diminuição da fosforilação fotossintética (Berghaus e Reisener, 1985), reações fotoquímicas (Mathre, 1968) e assimilação do dióxido de carbono (Lopes e Berger, 2001). Essas mudanças são frequentemente associadas com reduções na concentração de clorofila (Berghaus e Reisener, 1985), diminuição na condutância do mesófilo, redução na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Meyer et al., 2001) e também aumento na concentração de sacarídeos nas folhas (Livne e Daly, 1966).

A redução na fotossíntese está relacionada com a relação trófica na interação patógeno-hospedeiro. O impacto da infecção por *C. lindemuthianum* na fotossíntese está associado com a fase necrotrófica do patógeno, em que não ocorre inibição na assimilação líquida do CO₂ nos tecidos necrosados, mas sim diminuição na atividade fotossintética da área verde em torno do sítio de infecção, fechamento dos estômatos, redução da transpiração e da atividade da rubisco (Meyer et al., 2001).

O efeito do Si na fotossíntese e no estresse oxidativo de plantas de arroz sob condições de toxidez por cádmio foi estudado por Wang et al. (2000). Na presença do Si, houve incremento dos parâmetros de trocas gasosas, taxa de assimilação líquida de carbono (A_{max}), taxa de transpiração (E) e condutância estomática (g_s). Porém, com relação à fluorescência da clorofila *a*, o Si não interferiu na fluorescência mínima (F_o), mas houve aumento da fluorescência máxima (F_m) e da relação F_v/F_m (eficiência fotoquímica do fotossistema II) e diminuição da relação F_o/F_m . Em plantas de pepineiro sob estresse por cádmio, o fornecimento de Si reduziu a clorose e aumentou a concentração de pigmentos, o que pode ter contribuído para a maior taxa fotossintética e o acúmulo de biomassa com menor inibição da relação F_v/F_m (Feng et al., 2010).

Condições de estresses abióticos como déficit hídrico, toxidez por metais pesados e salinidade e aqueles de natureza biótica como infecção por patógenos favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Durner et al., 1998) e os radicais ânions superóxido (O_2^-) e hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998). As ERO interagem com ampla gama de moléculas, causando a peroxidação dos lipídeos na membrana plasmática (Fu e Huang, 2001). Para mitigar e reparar o dano provocado pelas ERO, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção, que consistem na produção de moléculas de baixo peso molecular e com propriedades antioxidantes, como o ascorbato, a glutathione α -tocoferol e os carotenoides, além das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e redutase da glutathione (GR) (Gunes et al., 2007). A SOD catalisa a desmutação do O_2^- para H_2O_2 e oxigênio. No entanto, o H_2O_2 , sendo citotóxico, é detoxificado pela CAT para produzir água e oxigênio (Zhu et al., 2004). No ciclo do ascorbato-glutathione, a APX reduz o H_2O_2 , usando o ascorbato como doador de elétrons (Noctor e Foyer, 1998). O ascorbato é oxidado na diminuição da glutathione reduzida (GHS) a partir da glutathione oxidada (GSSG), reação catalisada pela GR à custa da NADPH (Lin e Kao, 2000). Na presença de Si ocorreu aumento na atividade das enzimas antioxidativas em plantas de cevada, espinafre, pepino e trigo submetidas a diferentes condições de estresses abióticos (Gunes et al., 2007; Gong et al., 2008; Liang et al., 2008).

Para a interação feijoeiro-*C. lindemuthianum*, o estudo do Si nas trocas gasosas e no alívio do estresse oxidativo é ainda incipiente. Assim, este trabalho objetivou investigar o efeito desse elemento nas trocas gasosas e na atividade de algumas enzimas relacionadas com o metabolismo do estresse oxidativo em plantas de feijoeiro infectadas por *C. lindemuthianum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da solução nutritiva e crescimento das plantas de feijoeiro: a solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com Liao et al. (2001) e constituída de: 3 mMol L⁻¹ KNO₃; 2 mMol L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O; 0,5 mMol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,25 mMol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 mMol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 12,5 μMol L⁻¹ H₃BO₃; 1 μMol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,25 μMol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 μMol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; e 25 μMol L⁻¹ EDTA bissódico. O Si, fornecido como ácido monossilícico, foi obtido pela passagem do silicato de potássio por meio da resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, H⁺ forma, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2002). As concentrações de Si utilizadas foram de 0 e 2 mMol L⁻¹. A adição do ácido monossilícico à solução nutritiva não alterou o pH.

Sementes de feijoeiro (cv. Pérola) foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% (vol/vol) e, posteriormente, lavadas em água estéril por 2 min e germinadas em papel-filtro embebido com água estéril por dois dias a 25 °C. As plântulas foram mantidas por dois dias em solução nutritiva meia força iônica sem adição de Si. Após esse período, elas foram transferidas para novos vasos plásticos contendo 5 L de solução nutritiva com ou sem a presença de Si, sob aeração, até o final do experimento. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingia 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido em 5,5, empregando-se soluções de NaOH ou HCl (1 M) quando necessário.

Produção do inóculo: o isolado 81-538 da raça 81 de *C. lindemuthianum*, obtido da Micoteca do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia da UFV, foi utilizado neste estudo. O isolado dessa raça foi preservado em tiras de

papel-filtro dentro de tubos de vidro contendo sílica-gel a 4 °C. Pedacos de papel-filtro contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA). Para a produção do inóculo, pedacos de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo foram colocados na superfície de vagens de feijoeiro esterilizadas, cujas bases foram inseridas em meio ágar-água a 3% (vol/vol) contido em tubos de ensaio (Pastor-Corrales, 1985). Esses tubos foram armazenados em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro, por 10 dias. Após o crescimento micelial e a produção de acérvulos contendo conídios, adicionou-se água destilada aos tubos para obtenção da suspensão de conídios. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada para a concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios mL⁻¹, em hemacitômetro.

Plantas de feijoeiro no estágio V4 (Vieira, 1988) crescendo por 21 dias em solução nutritiva foram inoculadas, em ambas as faces das folhas, com a suspensão de conídios utilizando-se atomizador De Vilbiss nº 15. Gelatina a 1% (peso/vol) foi adicionada à água estéril utilizada para o preparo da suspensão de conídios para auxiliar na adesão dos conídios nas folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro a 20 ± 2 °C, com umidade relativa de 90% e fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro, por 24 h. Após esse período, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 21 ± 2 °C, umidade relativa de $95 \pm 2\%$ e fotoperíodo de 225 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. As plantas foram mantidas nessa câmara até o término dos experimentos.

Avaliação da severidade da antracnose: a severidade da antracnose foi avaliada nos três folíolos da quarta folha das plantas de cada repetição e tratamento, às 24, 48, 96, 120 e 144 h após a inoculação (hai), utilizando-se a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997).

Determinação das trocas gasosas: as trocas gasosas foram realizadas utilizando-se o sistema portátil de medição de fotossíntese modelo LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, EUA) equipado com fonte de luz artificial 6400-02B RedBlue. Determinaram-se a taxa de assimilação líquida do carbono ($A_{\text{máx}}$), a condutância estomática (g_s) e a taxa de transpiração (E). As medições foram realizadas com luz actínica (PAR) constante ($1.000 \mu\text{mol fôtons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e

concentração atmosférica de CO₂ (C_a) ($\approx 390 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente ($27^\circ\text{C} \pm 0,9$). Os valores da concentração interna de CO₂ (C_i) foram obtidos com base nos valores de $A_{\text{máx}}$, g_s e E , de acordo com Von Caemmerer e Farquhar (1981). As medições foram realizadas às 36, 48, 72, 120 hai, na quarta folha das plantas de cada repetição e tratamento no período das 8 às 11 h. As medições também foram realizadas na quarta folha das plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum*.

Determinação da concentração de pigmentos: amostras de 100 mg dos três folíolos da terceira folha das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas às 144 hai. As amostras foram trituradas em nitrogênio (N₂) líquido contendo 0,1 g de carbonato de cálcio e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL de acetona 80% (v/v), por 1 min, sob luz verde. A suspensão resultante foi filtrada em papel-filtro Whatman # 1. O resíduo foi lavado por três vezes em acetona 80% e o volume final, completado em balão volumétrico para 25 mL com o mesmo solvente. As absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm. As concentrações de clorofila *a* (Cl_a), clorofila *b* (Cl_b) e carotenoides foram estimadas de acordo com Lichtenthaler (1987).

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): amostras dos três folíolos da terceira folha das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 120 e 144 hai. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum* (0 hai) serviram como controle. As amostras foram armazenadas individualmente em papel-alumínio, rapidamente congeladas em N₂ líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C , para posterior análise. Para obtenção dos extratos usados na determinação da concentração de H₂O₂, 0,2 g de segmentos de tecido foliar, foram macerados com N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão-fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) contendo hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante, usado para determinar a concentração de H₂O₂ (Kuo e Kao, 2003). Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi adicionada a um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM em um volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e

a absorbância, determinada em espectrofotômetro a 560 nm. Brancos do reagente e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. A concentração de H_2O_2 nas amostras foi determinada utilizando-se uma curva de calibração preparada com H_2O_2 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

Determinação das atividades da catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e redutase da glutatona (RG, EC 1.11.1.6): amostras dos três folíolos da quarta folha das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 120 e 144 hai. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum* (0 hai) serviram como controle. As amostras foram armazenadas individualmente em papel-alumínio, rapidamente congeladas em N_2 líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C , para posterior análise.

Para os extratos das enzimas CAT, APX e SOD, 0,3 g de tecido foliar foi macerado com N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão-fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 g por 15 min, a 4°C , e o sobrenadante, usado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakman e Marschner (1993). A mistura de reação foi constituída de 50 mM de tampão-fosfato de potássio (pH 6,8) e 12,5 mM de H_2O_2 , num volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 0,35 mL do extrato da enzima, e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm, por 1 min. O coeficiente de extinção molar de $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de 50 mM de tampão-fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H_2O_2 e 0,8 mM de ascorbato, num volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 34 μL do extrato da enzima, e a atividade foi medida pela oxidação do H_2O_2 dependente do ascorbato a 290 nm, por 1 min. O coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático em 2,97 mL de mistura de reação constituída de tampão-fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida, e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). As amostras-controle tiveram absorbâncias medidas a 560 nm, utilizando-se mistura de reação mantida no escuro por 5 min, e os valores foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Peixoto et al., 1999).

Para obtenção do extrato da RG, 0,3 g de tecido foliar foi macerado com N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão-fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM, *DL*-ditioteitol 1 mM, PMSF 1 mM e PVP 2% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante, usado como extrato da enzima. A atividade da RG foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático a 0,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão-fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, glutatona oxidada 1 mM e NADPH 0,1 mM preparado em tampão TRIS-HCl 0,5 mM (pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorbância a 340 nm na temperatura de 30 °C foi medido no primeiro minuto após o início da reação. A atividade da RG foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Foyer e Halliwell, 1976), a qual foi expressa em $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1971), e todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata.

Determinação da concentração foliar de Si: após o término dos experimentos, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água deionizada e secas a 65 °C, durante 72 h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley provido de peneira de 40 mesh. A

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

Delineamento experimental e análise estatística: os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (-Si e +Si) e seis repetições. Um experimento foi conduzido para avaliar a severidade da antracnose e a concentração foliar de Si e outro, para avaliar as trocas gasosas e coletar as amostras para determinação da concentração de pigmentos e de peróxido de hidrogênio e das atividades enzimáticas. Cada unidade experimental correspondeu a um vaso contendo 5 L de solução nutritiva e três plantas de feijoeiro. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste-t ($P \leq 0,05$), utilizando-se o software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). A concentração foliar de Si foi correlacionada com as variáveis $A_{máx}$, g_s , E e C_i/C_a .

RESULTADOS

Concentração foliar de Si: a concentração foliar de Si foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) nas plantas supridas com esse elemento, com aumento de 52,4% em relação às plantas não supridas (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração de silício (Si) e severidade (Sev) da antracnose em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*

Tratamentos	Si (dag/kg)	Sev (%)
-Si	0,84	6,30
+Si	1,25	4,16
teste-t	*	*
C.V. (%)	16,58	14,72

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste-t.

C.V. = coeficiente de variação.

Severidade da antracnose: houve diferença (Tabela 1) significativa ($P \leq 0,05$) na severidade entre os tratamentos -Si e +Si. A severidade foi significativamente menor ($P \leq 0,05$) nas folhas das plantas supridas com Si, com decréscimo de 34% em relação às folhas das plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1).

Trocas gasosas: a g_s foi maior nas folhas das plantas supridas com Si em relação às daquelas não supridas com esse elemento (Fig. 1a). O maior valor de g_s nas folhas das plantas supridas com Si resultou em maiores de E (Fig. 1b). Embora a g_s foi maior nas folhas das plantas supridas com Si, a razão C_i/C_a foi significativamente maior nas folhas das plantas não supridas com Si (26,8% superior às 120 hai) (Fig.s 1c). As mudanças em $A_{máx}$ (Fig. 1d) foram inversas à taxa da relação C_i/C_a (58,2% de redução em $A_{máx}$ às 120 hai, nas folhas das plantas não supridas com Si). Nas

folhas das plantas não supridas com esse elemento, a redução em $A_{máx}$ foi muito maior do que na área verde, nos estádios mais avançados da infecção (redução de 79% em $A_{máx}$ e 6,3% na área verde). No tratamento +Si, os valores de $A_{máx}$ e área verde foram reduzidos em 51 e 4,1%, respectivamente, indicando que pequenos decréscimos na área foliar sadia contribuem para aumentar os valores da $A_{máx}$.

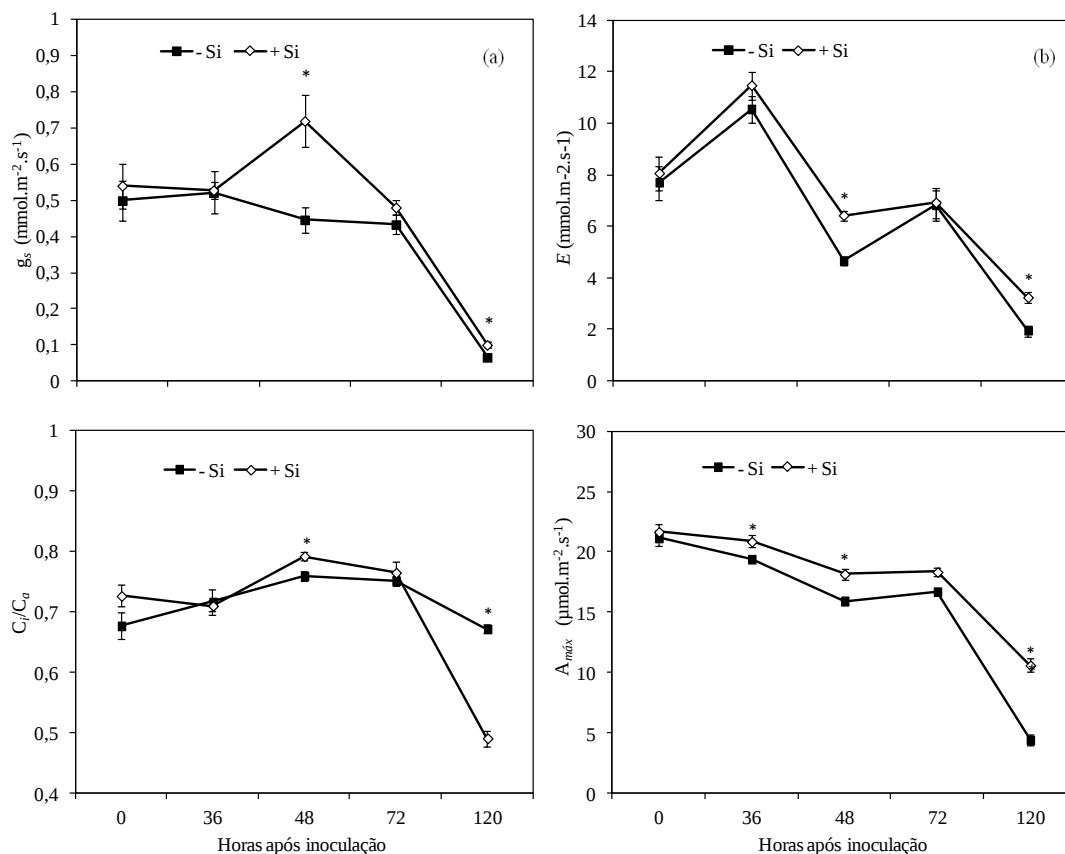


Figura 1 - Condutância estomática (g_s) (a), taxa de transpiração (E) (b), taxa de concentração de CO_2 interna vs. ambiente (C_i/C_a) (c) e taxa de assimilação líquida do CO_2 ($A_{máx}$) (d), determinadas em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras indicam o desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

Concentração de pigmentos: houve aumento na concentração de Cl_a , Cl_b , relação Cl_a/Cl_b e carotenoides nas folhas das plantas supridas com Si. Em Cl_a , os maiores valores ocorreram às 72, 120 e 144 hai (Fig. 2a). Diferenças significativas entre os tratamentos -Si e +Si ocorreram às 0, 48 e 120 hai (Fig. 2a). A concentração de Cl_b e

de carotenoides apresentou comportamento similar ao observado na concentração de Cl_a , com os maiores valores acontecendo às 72 e 120 hai, no tratamento +Si. Houve diferenças significativas na concentração de Cl_b e de carotenoides entre os tratamentos -Si e +Si, às 0 e 48 hai (Fig. 2b-d). Não houve diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si na relação Cl_a/Cl_b , em nenhuma das épocas de avaliação (Fig. 2c). No entanto, na presença de Si os valores foram maiores a partir das 72 hai até o final das avaliações.

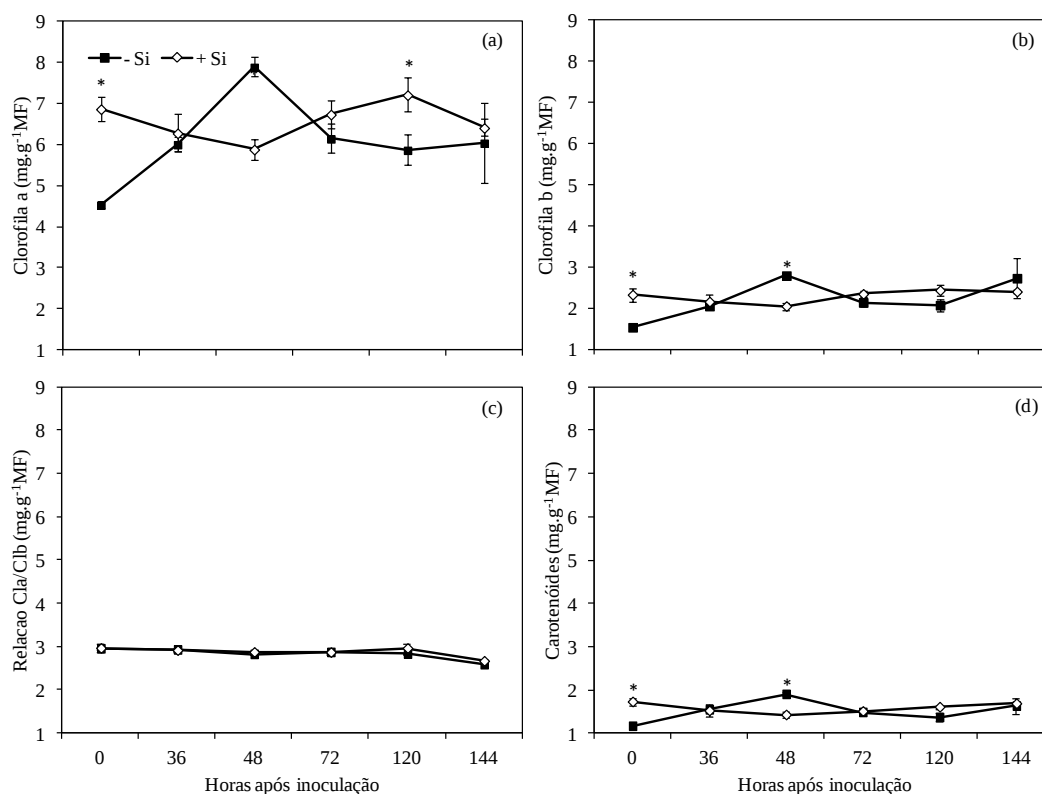


Figura 2 - Concentração de clorofilasa (Cl_a) (a), clorofila b (Cl_b) (b) e relação clorofila a/b (c) e carotenoides (d) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

Concentração de H_2O_2 : a maior concentração de H_2O_2 ocorreu nas folhas das plantas não supridas com Si, às 36, 48, 72 e 144 hai, porém diferenças significativas entre os tratamentos -Si e +Si aconteceram apenas às 36, 48 e 144 hai (Fig. 3).

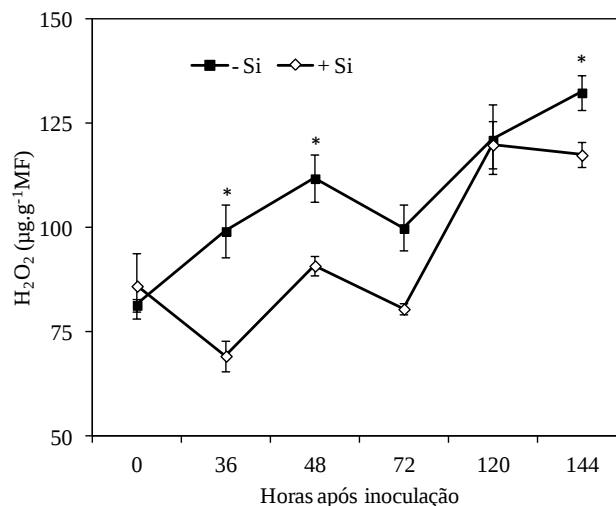


Figura 3 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

Atividades da CAT, APX, SOD e RG: a atividade da CAT foi significativamente maior às 120 hai, nas folhas das plantas supridas com Si (Fig. 4). Diferenças significativas entre os tratamentos -Si e +Si ocorreram às 72, 120 e 144 hai (Fig. 4). Após a inoculação com *C. lindemuthianum*, a atividade da APX mostrou-se superior nas folhas das plantas supridas com Si (Fig. 5), com diferenças significativas entre os tratamentos -Si e +Si, às 0, 36, 120 e 144 hai (Fig. 5). A atividade da SOD apresentou comportamento similar nos tratamentos -Si e +Si, com valores superiores e significativos no tratamento +Si, às 48, 72 e 144 hai (Fig. 6). Diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu somente às 36 hai (Fig. 6). A atividade da RG foi maior nas folhas das plantas supridas com Si, com diferença significativa às 36 e 72 hai em relação às plantas do tratamento -Si (Fig. 7). Diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si ocorreu somente às 120 hai (Fig. 7).

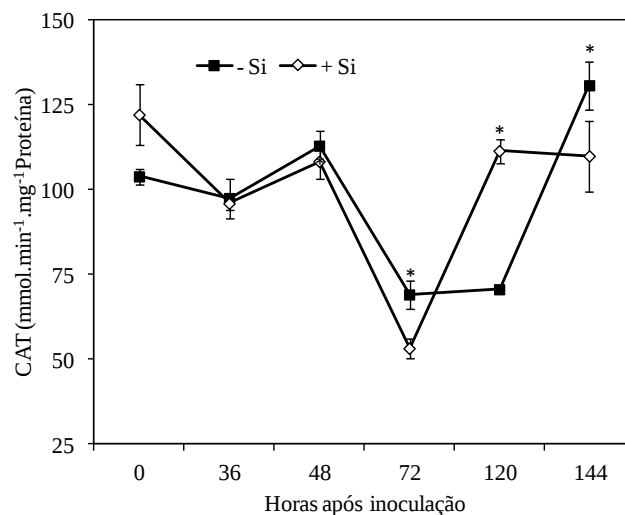


Figura 4 - Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

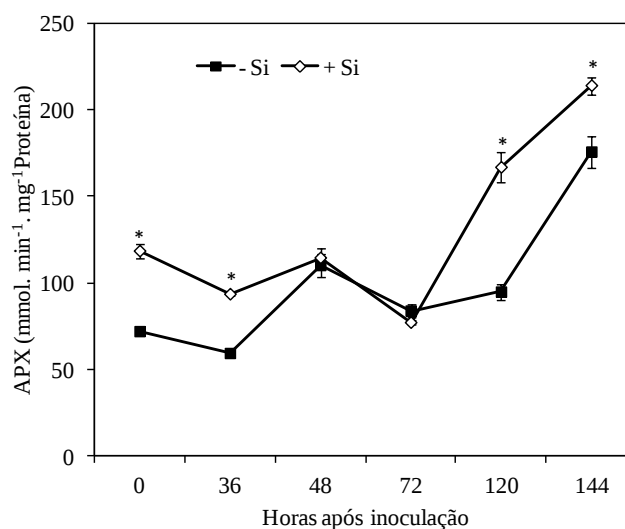


Figura 5 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

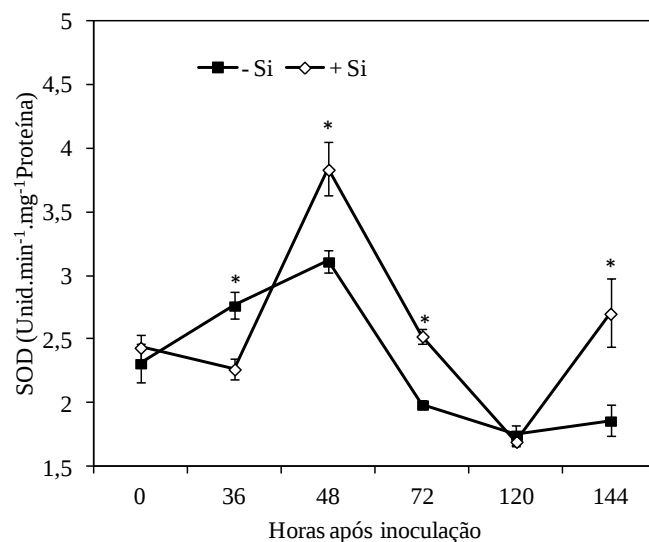


Figura 6 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

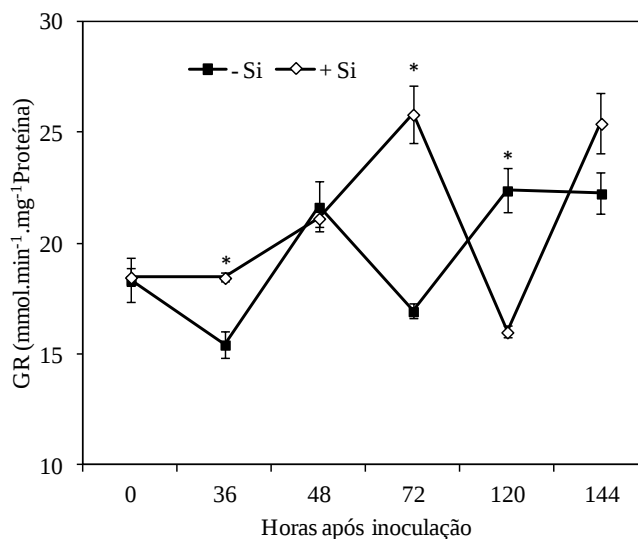


Figura 7 - Atividade da redutase da glutatona (RG) em folhas de plantas de feijoeiro crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) e 2 mMol (+Si) de silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Cada ponto representa a média de seis repetições. As barras correspondem ao desvio-padrão da média. Diferenças entre os tratamentos -Si e +Si pelo teste-t ($P \leq 0,05$) estão representadas por asterisco.

Correlação de Pearson: houve correlação significativa e negativa entre a concentração foliar de Si e a severidade da antracnose (Tabela 2). Os maiores coeficientes de correlação foram estabelecidos entre a severidade da antracnose e os parâmetros de trocas gasosas (A_{max} , E , g_s , C_i/C_a) (Tabela 2). Houve correlação significativa e negativa entre a severidade e g_s . Não houve correlação entre g_s e a taxa da relação C_i/C_a .

Tabela 2 - Correlação de Pearson entre as variáveis concentração foliar de silício (Si), severidade (Sev) da antracnose, taxa de assimilação líquida do CO_2 ($A_{máx}$), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e taxa de concentração de CO_2 interna vs. ambiente (C_i/C_a)

Variáveis	Si	Sev	$A_{máx}$	E	g_s	C_i/C_a
Si	1	-0,80*	0,89*	0,79*	0,64*	-0,91*
Sev		1	-0,92*	-0,96*	-0,89*	0,72*
$A_{máx}$			1	0,93*	0,87*	-0,84*
E				1	0,88*	-0,76*
g_s					1	-0,50 ^{ns}
C_i/C_a						1

^{ns} = não significativo e * = significativo a $P \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

Embora o Si não seja considerado elemento essencial às plantas, são bem conhecidos os seus benefícios para o crescimento e desenvolvimento, particularmente das gramíneas quando expostas a estresses de naturezas biótica e, ou, abiótica (Zhu et al., 2004; Datnoff et al., 2007). Doenças de importância econômica em culturas como arroz, cevada, centeio, milho, morango, pepino, soja, sorgo, trigo e uva foram eficientemente controladas pelo fornecimento de Si (Bélanger et al., 2003; Datnoff et al., 2007; Dallagnol et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). Neste estudo, plantas de feijoeiro supridas com Si apresentaram concentração média de 1,2% de Si, o que correspondeu a uma concentração semelhante à obtida por Liang et al. (2006) em plantas de pepineiro. A severidade da antracnose foi reduzida nas plantas supridas com Si, indicando o possível envolvimento desse elemento na potencialização da resistência basal à *C. lindemuthianum*. Na interação feijoeiro-*C. lindemuthianum*, ainda não foi estudado o efeito do Si nos aspectos fisiológicos e bioquímicos da resistência à antracnose.

A redução da severidade da antracnose nas plantas supridas com Si sugere a participação desse elemento em potencializar a resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum*. O envolvimento do Si no incremento da resistência em dicotiledôneas foi evidenciado por Menzies et al. (1992), os quais observaram mudança na expressão da defesa de células da epiderme de pepineiro colonizada por *Podosphaeria xanthii*. O acúmulo de compostos fenólicos nas células das raízes de plantas de pepineiro supridas com Si e infectadas por *Pythium ultimum* e o aumento na atividade das enzimas quitinases, peroxidases e polifenoloxidasas foram associados à diminuição da intensidade da doença (Chérif et al., 1992, 1994).

Em condições de estresse biótico e, ou, abiótico, as plantas aumentaram a produção de EROS, como H_2O_2 , O_2^- e OH^- , que oxidam pigmentos fotossintéticos e

causam danos à membrana plasmática, proteínas e ácidos nucleicos (Egert e Tevini, 2002). De acordo com Lima et al. (2002), o aumento nos danos celulares resulta de um desequilíbrio entre a produção de EROS e os mecanismos de defesa do hospedeiro em favor do primeiro. Os resultados deste estudo indicam redução na severidade da antracnose associada a uma diminuição na concentração de H_2O_2 nas folhas das plantas supridas com Si, indicando que o Si teve a capacidade de aliviar o dano oxidativo induzido pelo patógeno. Diminuição da produção de EROS foram reportados por Al-Aghabary et al. (2004) e Zhu et al. (2004) em plantas de tomateiro e pepineiro crescendo em condições de estresse salino.

O efeito da infecção por *C. lindemuthianum* nas variáveis relacionadas com as trocas gasosas foi maior nos estádios avançados da infecção. Após o aparecimento dos sintomas da antracnose, houve diminuição da fotossíntese. A diminuição da capacidade fotossintética foi maior do que se poderia esperar com relação à redução da área verde, o que indica que a fotossíntese foi inibida na área verde remanescente de folhas sintomáticas. Esses resultados estão em concordância com os encontrados por Meyer et al. (2001) e Bassanezi et al. (2001), os quais constataram que apenas 10% da área com sintomas de antracnose em folhas de feijoeiro reduziu $A_{máx}$ em mais de 50%, e valores superiores a 20% na área sintomática apresentaram $A_{máx}$ quase nula. A diminuição da severidade e o aumento de $A_{máx}$ indicam o efeito positivo do Si na ativação dos mecanismos de resistência basal que passam a limitar o processo infeccioso de *C. lindemuthianum*, portanto diminuindo a queda na fotossíntese.

A aplicação de Si aumentou g_s . Decréscimos paralelos em $A_{máx}$ e g_s evidenciam que o fechamento estomático esteve envolvido na redução da fotossíntese durante o processo infeccioso de *C. lindemuthianum*. À medida que ocorreu progresso nos sintomas da antracnose com o aparecimento da necrose nas nervuras, a disponibilidade de água diminuiu progressivamente, seguida pelo fechamento dos estômatos, incapacitando o tecido de transportar água, sais minerais e glicose. O déficit hídrico normalmente decresce a fotossíntese e a transpiração (Inamullah e Isoda, 2005), reduz a condutância estomática e, consequentemente, aumenta a resistência estomática (Ismail et al., 2004).

Um fato interessante foi que, embora g_s tenha sido maior nas plantas supridas com Si, a razão C_i/C_a foi maior naquelas não supridas, particularmente em estádios avançados da infecção por *C. lindemuthianum*, indicando que a capacidade do

mesófilo em fixar o CO₂ foi mais afetada nas plantas não supridas com Si. De acordo com Meyer et al. (2001), a redução da fotossíntese durante a infecção por *C. lindemuthianum* comprometeu a inibição estomática e metabólica, sugerindo que a inibição metabólica foi mediada pela inibição na regeneração da rubisco. Os resultados deste estudo não mostraram correlação entre g_s e a C_i/C_a , indicando que a taxa de fixação do CO₂ poderia ter mais dependência da limitação bioquímica do que estomática, independentemente da presença do Si.

A concentração de pigmentos fotossintéticos aumentou nas folhas das plantas supridas com Si. O incremento na razão Cl_a/Cl_b nas plantas supridas com Si foi relacionado com um respectivo incremento na concentração da Cl_a e Cl_b em razão, possivelmente, da maior eficiência fotorreceptora. Na presença do Si, houve aumento na concentração de carotenoides, indicando a importância deles na fotoproteção do sistema fotossintético pela dissipação do excesso de energia de excitação por meio do ciclo das xantofilas (Demming-Adams e Adams, 1992).

Sob condições normais de crescimento, muitos processos metabólicos nas plantas desencadeiam a produção de EROS, necessitando, assim, da existência de eficiente sistema de defesa antioxidante para removê-las, o qual envolve a ação das enzimas relacionadas com o metabolismo do estresse oxidativo (Gunes et al., 2007). O efeito do Si na atividade das enzimas antioxidantes é amplamente registrado na literatura (Gunes et al., 2007; Gong et al., 2008). Os resultados deste estudo indicam que o fornecimento de Si aumentou a atividade da SOD, APX e RG nas folhas das plantas infectadas por *C. colletotrichum*, porém sem nenhum efeito da CAT. Resultado semelhante foi obtido por Zhun et al. (2004), os quais observaram aumento na atividade da SOD, APX, RG guaiacol peroxidase e deidroascorbato redutase, com exceção da CAT em plantas de pepino mantidas sob estresse salino e na presença de Si. A partir do comportamento na atividade da APX, pode-se concluir que essa enzima foi mais importante do que a CAT na redução da concentração de H₂O₂ (Zhun et al., 2004; Gunes et al., 2007). A APX, a RG e a de-hidroascorbato redutase são as principais enzimas envolvidas no ciclo do ascorbato-glutatione e na presença do Si. As atividades da APX e da RG, embora semelhantes, aumentaram na presença de Si.

Os resultados deste trabalho sugerem que o Si pode estar envolvido nas atividades metabólicas e, ou, fisiológicas das plantas de feijoeiro infectadas por *C.*

lindemuthianum, principalmente por manter uma fotossíntese eficiente e aliviar o estresse oxidativo provocado pela infecção pelo patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Aghabary K, Zhu Z, Shi Q. (2004) Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and anti-oxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *J Plant Nutr* **27**:2101-2115.

Baker NR, Rosenqvist E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* **55**:1607-1621.

Bassanezi RB, Martins MC, Godoy CV, Amorim L, Bergamin-Filho A. (1997) Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatol Bras* **22**:520-524.

Bassanezi RB, Amorin L, Bergamin-Filho A, Hau B, Berger RD. (2001) Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. *Plant Pathol* **50**:1-11.

Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

Berger S, Sinha AK, Roitsch T. (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **58**:4019-4026.

Berghaus R, Reisener HJ. (1985) Changes in photosynthesis of wheat plants infected with wheat stem rust (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*). *J Phytopathol* **112**:165-172.

Cakmak I, Strboe D, Marschner H. (1993) Activities of hydrogen peroxides scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J Exp Bot* **44**:127-132.

Cherif M, Menzies J, Benhamou N, Bélanger RR. (1992) Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol* **41**:371-385.

Chérif M, Asselin A, Bélanger RR. (1994) Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* **84**:236-242.

Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW. (2007) Silicon and Plant Disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 233-246.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* **99**:116-121.

Demming-Adams B, Adams WW. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol* **43**:599-626.

Epstein E. (1999) Silicon. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:641-64.

Egert M, Tevini M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environ Exp Bot* **48**:43-49.

Foyer CH, Halliwell B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**:21-25.

Gay C, Gebicki JMA. (2000) Critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricxylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem* **284**:217-220.

Giannopolitis CN, Ries SK. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* **59**:309-314.

Godoy CV, Carneiro SM, Lamauti MT, Pria MD, Amorim L, Berger RD, Filho AB. (1997) Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **104**:336-345.

Gong HJ, Chen KM, Zhao ZG, Chen GC, Zhou WJ. (2008) Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages. *Biol Plant* **52**:592-596.

Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S. (2007) Silicon-mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. *J Plant Physiol* **164**:807-811.

Hall R. (1991) Compendium of Bean Diseases. The American Phytopathological Society, APS Press, St Paul, MN.

Hattori T, Inanaga S, Araki HP, Morita S, Luxova M, Lux A. (2005) Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiol Plant* **123**:459-466.

Inamullah K, Isoda A. (2005) Adaptative responses of soybean and cotton to water stress. *Plant Prod Sci* **8**:16-26.

Isamil MR, Yusoff MK, Mahmood. (2004) Growth, water relations, stomatal conductance and proline concentration in water stressed banana (*Musa* sp) plant. *Asian J Plant Sci* **3**:709-713.

Iturbe-Ormaetxe I, Escudero PR, Arrese-Igor C, Becana M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol* **116**:173-181.

Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) *Análise de silício: solo, planta e fertilizante*. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 24 pp.

Kuo MC, Kao CH. (2003) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol Plant* **46**:149-152.

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro H, Totola MR, Loureiro ME. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**:239-247.

Lin CC, Kao CH. (2000) Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul* **30**:151-155.

Liao H, Yan X, Rubio G, Beebe SE, Blair MW, Lynch JP. (2004) Genetic mapping of basal root acquisition efficiency in common bean. *Funct Plant Biol* **31**:959-970.

Livne A, Daly JM. (1966) Translocation in healthy and rust affected beans. *Phytopathology* **56**:170-175.

Lopes DB, Berger RD. (2001) The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. *Phytopathology* **91**:212-220.

Ma JF, Takahashi E. (2002). Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan, 1st ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

Mathre DE. (1968) Photosynthetic activities of cotton plants infected with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* **58**:137-141.

Meyer S, Saccardy K, Rizza F, Genty B. (2001) Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell Environ* **24**:947-955.

Menzies J, Bowen P, Ehret DL, Glass ADM. (1992) Foliar application of potassium silicate reduce severity of powdery on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. *J Am Soc Hortic Sci* **117**:902-905.

Nakano Y, Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**:867-880.

Noctor G, Foyer H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**:249-279.

Lichtenthaler HK. (1987) Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L. Douce, R. (eds.) *Methods Enzimol* **148**:350-381.

Pastor-Corrales M. (1985) Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: López M, Fernández F, Schoonhoven A. (eds) *FRIJOL: Investigación y Producción*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 172-180.

Peixoto PHP, Cambraia J, Santana R, Mosquim PR, Moreira MA. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Braz J Plant Physiol* **11**:137-143.

Peloso MJ. (1992) Antracnose do Feijoeiro no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: Pastor-Corrales (eds) *La antracnosis del Frijol Común, Phaseolus vulgaris*, en América Latina Doc. de trabajo 113. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 86-108.

Pria MD, Silva OC, Costa JLS, Souza EDT, Berni RF. (1999) Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico In: Canteri MG, Pria MD, Silva OC (eds). Ponta Grossa, pp.17-34.

Rava CA, Purchio AF, Sartorato A. (1994) Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatol Bras* **19**:167-172.

Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndörfer GH, Zambolin L. (2009) Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australas Plant Pathol* **38**:366-372.

Singh S, Pastor-Corrales MA, Molina A, Otoy M. (1992) Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: *La antracnosis del frijol común, Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Doc. De Trabajo No. 113. M. Pastor-Corrales, ed. CIAT, Cali, pp 198-211.

Vieira C. (1988) Doenças e Pragas do Feijoeiro. 2nd. Ed. Viçosa. MG. Imprensa Universitária.

Von Caemmerer S, Farquhar GD. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**:376-387.

Wang L, Wang W, Chen Q, Cao W, Li M, Zhang F. (2000) Silicon induced cadmium tolerance of rice seedlings. *J Plant Nutr* **23**:1397-1406.

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

CAPÍTULO 3

CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO COM SILÍCIO, MOLIBDÊNIO E FUNGICIDA

RESUMO

Este estudo teve por objetivo determinar se a pulverização foliar de silicato de potássio (KSi) e molibdato de sódio (Mo) poderia diminuir a intensidade da antracnose no feijoeiro. Dois experimentos de campo foram instalados em delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 2×4 , com três repetições. O fator principal correspondeu à aplicação ou não de fungicida em combinação com quatro tratamentos de aplicação de micronutrientes (sem micronutrientes, KSi, Mo, Mo+KSi). Os tratamentos foram: (1) sem pulverização de fungicida ou micronutrientes; (2) pulverização de silicato de potássio (KSi); (3) pulverização de molibdato de sódio (Mo); (4) pulverização de KSi+Mo; (5) pulverização de fungicida (Fung); (6) pulverização de Fung+KSi; (7) pulverização de Fung+Mo; e (8) pulverização de Fung+KSi+Mo. O silício foi aplicado como silicato de potássio (KSi) na dose de 35 g L^{-1} , o molibdênio como molibdato de sódio (NaMo) na dose de 90 g ha^{-1} e o fungicida de ingrediente ativo Azoxistrobina na dose de 120 g ha^{-1} . As plantas pulverizadas com água serviram de testemunha nos dois experimentos. O KSi foi aplicado aos 20, 25, 40, 55 dias após a semeadura (das), correspondendo aos estádios V3, V4, R5, R6, respectivamente. O NaMo foi aplicado somente no estágio V4, enquanto o fungicida Azoxistrobina, nos estádios de desenvolvimento V3, R5, R6. As plantas foram inoculadas artificialmente com *Colletotrichum lindemuthianum* antes da aplicação dos produtos. Todas as variáveis, exceto o rendimento, foram avaliadas na amostra destrutiva semanal a partir dos 35 dias pós-semeadura (dps). A pulverização do fungicida diminuiu a área abaixo da curva do progresso da antracnose (AADPA) em cerca de 60% e incrementou a produção de grãos em aproximadamente 62%, já a pulverização foliar com KSi e Mo elevou o rendimento em torno de 11% e 19%, respectivamente. A AADPA reduziu-se em cerca de 29% e 14% com a aplicação de KSi e Mo. A

pulverização com KSi não resultou em efeito significativo sobre as variáveis de incremento (LAI, HLAI) e duração da área foliar (LAD, HAD). O Mo contribuiu para incrementar significativamente as variáveis de desenvolvimento (LAI, HLAI), duração (LAD, HAD) da área foliar e interceptação e aproveitamento da radiação pela área foliar (RI, HRI, HAA), em valores superiores aos apresentados pela aplicação do fungicida. Os resultados apontaram para a possibilidade de se utilizar a aplicação foliar de KSi em associação com o NaMo, para aumentar a resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum* e, conseqüentemente, obter ganho na produção de grãos.

ABSTRACT

Control of Anthracnose in Bean Plants by Using Silicon, Molybdenum and Fungicide

The objective of this study was to determine if foliar pulverization of potassium silicate (KSi) and sodium molybdate (Mo) could decrease the intensity of anthracnose in common bean plants. Two field experiments were installed in a random block experimental design in 2×4 factorial design with three replications. The main factor corresponded to the application or not of fungicide in combination with four treatments of micronutrients application (without micronutrients, KSi, Mo, Mo + KSi). The treatments were: (1) without fungicide or micronutrient pulverization, (2) potassium silicate (KSi) pulverization; (3) sodium molybdate (Mo) pulverization; (4) KSi + Mo pulverization; (5) fungicide pulverization (Fung); (6) Fung + KSi pulverization; (7) Fung + Mo pulverization, and (8) Fung + KSi + Mo pulverization. Silicon was applied as potassium silicate (KSi) at a dose of 35 g L^{-1} , molybdenum as sodium molybdate (Namo) at a dose of 90 g ha^{-1} and Azoxistrobin active ingredient fungicide at a dose of 120 g ha^{-1} . Plants pulverized with water served as control in the two experiments. Potassium silicate was applied at 20, 25, 40, 55 days after sowing (DAS), corresponding to stages V3, V4, R5, R6, respectively. Sodium molybdate was applied only at V4 stage whereas fungicide Azocistrobin were applied in the development stages V3, R5, R6. The plants were artificially inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum* before application of the products. All variables except yield, were assessed at weekly destructive sampling from 35 days after sowing (DAS). Pulverization with fungicide reduced the area under the curve of anthracnose progress (ABCAP) by approximately 60% and increased grain production by about 62% but foliar pulverization with KSi and Mo increased the yield by around 11% and 19%, respectively. The area under the

antracnose progress curve was reduced by about 29% and 14% by applying KSi and Mo. Pulverization with KSi resulted in no significant effect on the increase variables (LAI, HLAI) and leaf area duration (LAD, HAD). Molybdenum contributed to significantly increase the development variables (LAI, HLAI), leaf are duration (LAD, HAD) and interception and use of radiation by the leaf area (RI, HRI, HAA) at amounts higher than those presented by fungicide application. The results pointed to the possibility of using foliar application of KSi in association with NaMo, to increase resistance by the bean plant to infection by *C. lindemuthianum* and thus to obtain gains in grain yield.

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus), é uma das doenças mais severas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), acarretando grandes perdas na produção (Vieira, 1988). Em condições favoráveis ao progresso da doença, como alta umidade relativa e temperatura entre 18 e 20 °C, a produtividade é drasticamente reduzida (Vieira, 1988). A doença está presente em todos os continentes, e no Brasil ocorre na maioria dos estados (Pria et al., 1999). A antracnose afeta as plantas de feijoeiro em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes (Araujo, 1988). Em condições de alta temperatura, o fungo penetra os tecidos do hospedeiro e nas primeiras horas é biotrófico, tornando-se posteriormente necrotrófico (Bayle et al., 1992).

A implementação de estratégia de manejo da antracnose na cultura do feijoeiro requer informações precisas e acuradas sobre o dano causado pelo patógeno. O dano é definido como qualquer diminuição na qualidade ou na quantidade da produção que é resultante de um sintoma visível causado por patógenos (Bergamin Filho, 1995). Assim, a quantificação da doença, normalmente expressa como severidade ou área sob a curva de progresso da doença, é importante para estabelecer o nível de dano na produção (James, 1974; Kranz, 1988). A relação entre a redução da produção e a severidade na maioria das vezes não ocorre (Bergamin Filho, 1997). Análises desenvolvidas por Waggoner e Berger (1987) e baseadas nos estudos clássicos de Monteith (1972) mostraram que a produção de grãos, ou matéria seca, é função, em grande parte dos casos, da área fotossinteticamente ativa (sadia) da planta e não da área doente, definindo conceitos como índice de área foliar sadia (HLAI), duração da área foliar sadia (HAD), radiação interceptada pela copa sadia da planta (HRI) e absorção da área foliar sadia (HAA). Johnson (1987) refinou ainda mais esse conceito ao propor que a produção é função não só da área foliar sadia e da radiação

absorvida pelas folhas, mas também da eficiência fotossintética da planta. A potencialidade da abordagem de HAD e HAA tem sido evidenciada na literatura em diversas interações, como arroz-*Pyricularia grisea* (Bastiaans et al., 1991; Pinnschmidt et al., 1994), trigo-*Puccinia recondita* f.sp. *tritici* (Subba Rao et al., 1989), trigo-*Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* (Daamem e Jorritsma, 1990), soja-*Phakopsora pachyrhizi* (Yang et al., 1991), feijoeiro-*C. lindemuthianum* e *Uromyces appendiculatus* (Lopes e Berger, 2000), feijoeiro-*Phaeoisariopsis griseola* (Nunes e Bergamin Filho, 1996; Bergamin Filho et al., 1997), feijoeiro-*C. lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola* (Bassanezi et al., 2001).

Diferentes métodos podem ser empregados no controle da antracnose (Canteri et al., 1999). A utilização de cultivares de feijoeiro resistentes à antracnose é a forma menos onerosa em relação à aplicação de fungicidas (Singh et al., 1992; Vieira, 1998). No entanto, a existência de várias raças fisiológicas do patógeno representa um obstáculo para a obtenção de novos cultivares de feijoeiro resistentes (Rava et al., 1993). A aplicação de fungicidas reduz a severidade da antracnose e aumenta a produção de grãos (Oliveira, 2003; Santini et al., 2005), mas o seu uso é limitado devido aos problemas ambientais, além do risco do surgimento de populações resistentes do patógeno. Assim, métodos alternativos de controle ambientalmente sustentáveis precisam ser pesquisados.

A nutrição mineral é fator ambiental de fácil manipulação para o controle das 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 (Marschner, 1988). Embora o silício (Si) não seja considerado elemento essencial para as plantas superiores (Epstein, 1999), a literatura científica registra o potencial desse elemento em reduzir estresses bióticos e aumentar a resistência das plantas ao ataque por patógenos (Carver et al., 1987; Kim et al., 2002; Rodrigues et al., 2003, 2005; Fauteux et al., 2005; Liang et al., 2006). Entre os mecanismos de defesa potencializados pelo Si estão a formação de uma barreira física abaixo da cutícula após a polimerização do ácido monossilício e o aumento na produção de compostos fenólicos e fitoalexinas, além da maior atividade de enzimas associadas com a resistência da planta (Kim et al., 2002; Rodrigues et al., 2005). Em dicotiledôneas como pepino, melão e abóbora, a pulverização de silicato de potássio reduziu o número de colônias de míldio pulverulento (Menzies et al., 1992). Em feijoeiro, a aplicação foliar de silicato de sódio diminuiu em 62,4% a área

abaixo da curva do progresso da severidade da antracnose (Moraes et al., 2005). A pulverização de silicato de potássio nas doses de 0 a 60 g/L aumentou a concentração de Si nas folhas em 58%, independentemente do pH da solução (Rodrigues et al., 2010). A maior dose de silicato de potássio diminuiu a severidade da mancha-angular em 42% e 30% e o desfolhamento em 17% e 33%, em valores de pH 5 e 10, respectivamente, em relação à não pulverização desse produto. A produção de grãos aumentou em 30% e 43% quando as doses de silicato de potássio aumentaram de 0 a 60 g L⁻¹, em valores de pH 5 e 10, respectivamente.

O molibdênio (Mo) é um micronutriente essencial para as plantas, pela sua atividade como metal catálico durante as reações redox de algumas enzimas. Quatro enzimas das plantas são dependentes do Mo: nitrato redutase (NR), sulfito oxidase (SO), xantina desidrogenase (XD) e aldeído oxidase (AO). A fim de ganhar atividade biológica, o Mo tem sido complexado por um composto pterina formando o molibdopterina (Moco) (Mendel, 2007). O Moco está particularmente envolvido nas enzimas que participam direta ou indiretamente no metabolismo do nitrogênio, nitrogenase e redutase do nitrato e é essencial para aumentar o metabolismo do nitrogênio (Marschner, 1986; Taiz e Geizer, 2004). O possível mecanismo do Mo na resistência das plantas às doenças ainda não está esclarecido, no entanto a diminuição na quantidade de Mo no solo pode reduzir a resistência às doenças ao impedir a produção da nitrato redutase, enzima que contém duas moléculas de Mo e que é requerida para converter os nitratos em proteínas (Kaiser et al., 2005). O Moco também participa na síntese das fitormonas ácido abscísico e ácido indol-3-butírico (Kaiser et al., 2005). A perda da atividade das enzimas Mo-dependentes (direta ou indiretamente dos baixos níveis de Mo interno) impacta o desenvolvimento das plantas, em particular os processos envolvendo o metabolismo do nitrogênio e da síntese das fitormonas ácido abscísico e ácido indol-3-butírico (Kaiser et al., 2005).

Dutta e Bremmer (1981) e Miller e Becker (1983) observaram que o Mo reduziu 18% a 37% os sintomas da murcha do tomateiro causada por *Verticillium*. Halsall (1977) obteve evidências da inibição da formação de zoosporângios de *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora drescheleri* pelo Mo. A aplicação de Mo no solo diminuiu a população do nematoide *Rotylenchus reniformis* em mamona (Haque e Mukhopadhyaya, 1983). Jesus et al. (2004) mostraram que uma única aplicação de molibdato de sódio em plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura reduziu a severidade da mancha-angular e aumentou a área sadia das

folhas, a fotossíntese e a produção de grãos. A combinação do controle químico, aplicado uma ou duas vezes durante o intervalo dos 25 aos 45 dias após a semeadura, com a aplicação de molibdato de sódio aos 25 dias no dossel do feijoeiro, incrementou o crescimento das plantas e reduziu a severidade da mancha-angular (Jesus et al., 2004).

Não há na literatura nenhuma informação a respeito do efeito do Si e do Mo e da combinação desses elementos no controle da antracnose do feijoeiro. Assim, este trabalho objetivou determinar a eficiência da pulverização foliar de silicato de potássio e de molibdato de sódio em diminuir os sintomas da antracnose e aumentar a capacidade fotossintética das plantas e, conseqüentemente, da produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas de feijoeiro e tratamentos: dois experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, entre março e maio e entre setembro e dezembro de 2009. Os resultados da análise química do solo revelaram os seguintes valores: pH em H₂O 5,4; P 17 mg dm⁻³; K 80 mg dm⁻³; Ca²⁺ 3,41 cmol dm⁻³; Mg²⁺ 0,44 cmol dm⁻³; e Al³⁺ 0,0 cmol dm⁻³. A concentração de Mo no solo foi de 0,2 mg/kg de solo, inferior ao valor estabelecido como normal, o qual varia de 0,5 a 5 mg/kg de solo (Gupta e Lipsett, 1981). O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 2 × 4 com três repetições. O fator principal correspondeu à aplicação ou não de fungicida em combinação com quatro tratamentos de aplicação de micronutrientes (sem micronutrientes, KSi, Mo, Mo+KSi). Os tratamentos foram: (1) sem pulverização de fungicida ou micronutrientes; (2) pulverização de silicato de potássio (KSi); (3) pulverização de molibdato de sódio (Mo); (4) pulverização de KSi+Mo; (5) pulverização de fungicida (Fung); (6) pulverização de Fung+KSi; (7) pulverização de Fung+Mo; e (8) pulverização de Fung+KSi+Mo. Cada parcela experimental foi composta de cinco linhas de 5 m de comprimento espaçadas 0,5 m, perfazendo uma área de 12,5 m². A distância entre as parcelas foi de 1 m. Para evitar a contaminação entre as parcelas pulverizadas, apenas as três fileiras centrais de cada parcela foram utilizadas para avaliação das plantas. O 0,5 m inicial e final de cada parcela foi omitido nas avaliações. Doze sementes do cultivar Pérola (tipo Carioca) suscetível à antracnose foram semeadas para obter uma população de 10 plantas por metro. As parcelas foram mantidas usando-se as práticas convencionais da cultura do feijoeiro, as quais incluíram fertilização na semeadura, com base nos resultados das análises químicas do solo, que foram de 20 kg ha⁻¹ de nitrogênio, 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O, pulverização com inseticida, capina-irrigação por aspersão,

quando necessário. A fonte de Si usada nas pulverizações foi o silicato de potássio (Ferti Sil[®], PQ Silicas, São Paulo, Brasil; 26,7% SiO₂ e 13,1% K₂O) na dose de 35 g/L. O molibdênio foi aplicado na forma de molibdato de sódio, na dose de 90 g/ha. O fungicida Azoxistrobina (Amistar 50 WG[®], Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, Brasil) foi aplicado na dose de 120 g/ha. Plantas pulverizadas com água serviram como tratamento-controle nos dois experimentos. O KSi foi aplicado aos 20, 25, 40 e 55 dias pós-semeadura (dps), correspondendo, respectivamente, aos estádios V3, V4, R5 e R6 (Vieira, 1998). O molibdato de sódio foi aplicado nas plantas em estágio V4 e o fungicida, nos estádios V3, R5 e R6. As plantas de cada parcela foram pulverizadas com aproximadamente 500 mL de solução com pulverizador costal pressurizado a CO₂ de duas barras (45 lb/pol⁻²) com bicos Teejet 110,03 (São Paulo, Brasil).

Produção do inóculo e inoculação das plantas de feijoeiro com *C. lindemuthianum*: foi utilizado o isolado 81-538 da raça 81 de *C. lindemuthianum*, obtido da Micoteca do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia da UFV. O isolado dessa raça foi preservado em tiras de papel-filtro dentro de tubos de vidro contendo sílica-gel a 4 °C. E discos de papel-filtro contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-água (BDA). Para a produção do inóculo, pedaços de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo foram colocados na superfície de vagens de feijoeiro esterilizadas, cujas bases foram inseridas em meio ágar-água 3% (vol/vol) contido em tubos de ensaio (Pastor-Corrales, 1985). Esses tubos foram armazenados em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro, por 10 dias. Após o crescimento micelial e a produção de acérvulos contendo conídios, adicionou-se água destilada aos tubos para obtenção da suspensão de conídios. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada para a concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios mL⁻¹ em hemacitômetro. Gelatina 1% (peso/vol) foi adicionada à suspensão para facilitar a adesão dos conídios à superfície das folhas. As plantas de todas as fileiras de cada parcela foram inoculadas a partir das 18 h, com a suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* (aproximadamente 500 mL da suspensão por parcela), usando-se pulverizador costal pressurizado a CO₂ (45 lb pol⁻²) com bico Teejet 110,03 (São Paulo, Brasil), aos 23 dias após a emergência das plantas (estádio

V3). A inoculação com *C. lindemuthianum* foi realizada três dias depois da aplicação de molibdato de sódio e da primeira aplicação de KSi.

Avaliação da severidade da antracnose: a severidade da antracnose foi determinada nas folhas das plantas coletadas para avaliação do crescimento a partir dos 35 dias pós-semeadura (dps) e com frequência semanal. A severidade foi determinada como porcentagem da área foliar doente utilizando a escala diagramática de Godoy et al. (1997). Os dados de severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA) por integração trapezoidal da curva do progresso da doença, de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1977).

Determinação da produção de grãos: a produção de grãos (g/planta) foi determinada nas plantas das três fileiras centrais de cada parcela, totalizando uma área de 6 m² e aproximadamente 120 plantas. As sementes foram pesadas com 12% de água.

Obtenção das variáveis integrais: calculou-se o índice de área foliar (LAI) multiplicando a média da área foliar das 20 plantas por m² e expressando-a em m²/m². Com base no LAI, obteve-se o índice de área foliar sadia (HLAI), expresso em m²/m² (Waggoner e Berger, 1987), assim:

$$HLAI = LAI (1 - X)$$

em que x = severidade da antracnose. Através da integração do tempo dos valores do índice de área foliar (LAI), obteve-se o índice de duração da área foliar (LAD), expresso em dias, conforme definido por Watson (1947):

$$LAD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{LAI_i + LAI_{i+1}}{2} \right] [t_{i+1} - t_i]$$

A duração da área foliar sadia (HAD), expressa em dias, foi calculada para cada planta, de acordo com Waggoner e Berger (1987):

$$HAD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{LAI_i (1 - X_i) + LAI_{i+1} (1 - X_{i+1})}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

A radiação interceptada (RI), expressa em MJ m⁻², foi calculada pela seguinte fórmula:

$$RI = I_i [1 - \exp(-k LAI)]$$

em que I = média da radiação solar incidente no tempo entre as avaliações e k = coeficiente de extinção (Bergamin Filho et al., 1997). Para o feijoeiro, utilizou-se o valor de 0,7 para k (Pengelly et al., 1999).

A absorção da área sadia (HAA), expressa em MJ m⁻², de cada planta foi calculada de acordo com Waggoner e Berger (1987):

$$HAA = \left(\frac{RI_i + RI_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

A eficiência de uso da radiação (RUE), expressa em g MJ⁻¹, foi estimada por meio da análise de regressão entre a massa de matéria seca acumulada na planta (g/m) e a soma da radiação HAA interceptada semanalmente (MJ m⁻²), conforme Sinclair e Muchow (1999):

$$RUE = \text{Rendimento} / HAA$$

Análise estatística dos dados: os dados das variáveis avaliadas em cada experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos, comparadas pela análise de contrastes ortogonais (sem micronutrientes vs. com micronutrientes, sem silício vs. com silício e sem molibdênio vs. com molibdênio), utilizando-se o software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Crescimento das plantas de feijoeiro: no primeiro experimento, houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) para LAI e HLAI nos tratamentos com e sem aplicação de fungicida (Tabela 1). Os valores de LAI e HLAI foram significativamente maiores nas plantas que receberam aplicação de fungicida com incremento de 13,9% e 11,53%, respectivamente, em relação às plantas que não foram pulverizadas com fungicida (Tabela 1). Com o molibdato de sódio, houve aumento significativo ($P \leq 0,05$) nos valores de LAI e HLAI (Tabela 2). O LAI não foi afetado por KSi, mas nos tratamentos +Mo e KSi+Mo aumentou em 22,48% e 27,84%, respectivamente, em comparação com o tratamento-controle (Tabela 3). Nos tratamentos KSi, +Mo e KSi+Mo houve aumento significativo para o HLAI em 8,46; 28,89; e 40,16%, respectivamente (Tabela 3). No segundo experimento, o tratamento com fungicida incrementou significativamente LAI e HLAI em 7,22% e 8,29%, respectivamente (Tabela 4). O tratamento +Mo elevou significativamente ($P \leq 0,05$) os valores de LAI e HLAI (Tabela 5). O tratamento KSi não afetou as variáveis LAI e HLAI. Os tratamentos +Mo e KSi+Mo aumentaram o LAI em 32,45% e 44,25%, respectivamente. Os tratamentos +Mo e KSi+Mo elevaram o HLAI em 32,33% e 45,78%, respectivamente, em relação ao tratamento- controle (Tabela 6).

AACPA e produção de grãos: no primeiro experimento houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) na severidade e AACPA entre os tratamentos sem e com aplicação foliar de fungicida. A severidade e a AACPA foram significativamente menores ($P \leq 0,05$) nas plantas pulverizadas com fungicida, com decréscimo de 66,64% e 67,65%, respectivamente, em relação às plantas do tratamento-controle (Tabela 1). Nos tratamentos KSi, +Mo e KSi+Mo, a severidade decresceu significativamente em 25,58; 12,03%; e 34,88%, respectivamente. Houve

decréscimos de 23,78; 11,85; e 32,79% na AACPA, nos tratamentos KSi, +Mo e KSi+Mo, respectivamente (Tabelas 2 e 3). A produção de grãos foi significativamente maior nas plantas que receberam fungicida com aumento de 62,47%, em relação às plantas do tratamento-controle (Tabela 1). Os tratamentos KSi, +Mo e KSi+Mo aumentaram significativamente a produção de grãos em 6,16%; 11,64%; e 46,45%, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadia (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área foliar sadia (HAD), radiação interceptada pela área foliar sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 1

Fungicida	Sev (%)	AACPA	LAI	HLAI	LAD	HAD	HRI	HAA	RI	RUE	Prod (g/planta)
Sem	5,518	326,17	2,01	1,92	88,76	85,00	9,53	414,79	9,71	0,21	1,83
Com	1,841	105,54	2,20	2,17	97,28	95,69	10,07	437,23	10,13	0,49	5,51
QM	81,14*	29206,16*	0,21*	0,37*	435,71*	685,97*	1,75*	3019,30*	1,058*	0,487*	711,11*
C.V. (%)	13,94	14,15	7,81	7,78	7,38	7,46	3,01	2,76	2,92	3,34	3,38

*Significativo a 5%.

QM = quadrado médio.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 2 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *C. lindemuthianum* e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 1

Tratamentos	Sev (%)		AACPA		LAI		HLAI		LAD		HAD		HRI		HAA		RI		RUE		Prod (g/planta)	
	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com
Controle	6,59	2,39	382,4	137,7	1,64	1,90	1,56	1,86	72,04	84,30	68,47	82,51	8,776	9,58	380,8	416,9	9,00	9,67	0,20	0,44	6,49	15,44
KSi	5,07	1,61	303,2	93,26	1,81	2,02	1,72	1,99	79,22	88,49	75,97	87,05	9,103	9,83	394,4	425,7	9,27	9,89	0,21	0,45	7,13	16,15
Mo	5,71	2,19	335,8	124,5	2,25	2,32	2,13	2,28	99,26	103,4	94,46	101,4	10,06	10,26	438,4	446,4	10,24	10,31	0,18	0,47	6,83	17,66
KSi + Mo	4,69	1,16	283,0	66,61	2,35	2,57	2,26	2,54	104,5	112,8	101,0	111,7	10,19	10,62	445,3	459,7	10,34	10,65	0,23	0,61	8,65	23,38
QM	2831*		8312,16*		0,60*		0,59*		1240,14*		1229,82*		1982*		3931,08*		1,82*		0,013*		30,63*	
C.V. (%)	10,66		10,26		5,6		5,6		5,4		5,5		2,2		2,0		2,1		3,8		3,2	

* Significativo a 5%.

QM. = quadrado médio.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 3 - Quadrado médio das variáveis severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da doença (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* experimento 1

Contrastes	Sev	AACPA	LAI	HLAI	LAD	HAD	HRI	HAA	RI	RUE	Prod (g/planta)
-KSi vs. +KSi	3.95**	11468.22**	0.06 ^{ns}	0.06*	96.95 ^{ns}	108.60 ^{ns}	0.24*	378.675*	0.81 ^{ns}	0.0003 ^{ns}	1,36*
-Mo vs. +Mo	0.87*	2675.75*	0.79**	0.73**	1613.56**	1514.70**	2.89**	5698.52**	2.66**	0.0007 ^{ns}	4,91**
-KSi-Mo vs. +KSi+Mo	7.36**	21809.50**	1.40**	1.42**	2796.85**	2868.44**	4.50**	8652.14**	4.02**	0.029**	76,45*

**Significativo pelo teste de F a 1%.

*Significativo pelo teste de F a 5%.

Tabela 4 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadia (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área foliar sadia (HAD), radiação interceptada pela área foliar sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 2

Fungicida	Sev (%)	AACPA	LAI	HLAI	LAD	HAD	HRI	HAA	RI	RUE	Prod (g/planta)
Sem	1,81	53,50	2,32	2,28	64,01	62,75	17,66	450,14	16,68	0,18	6,96
Com	1,10	22,11	2,51	2,48	68,82	68,12	18,42	467,56	17,36	0,45	17,73
QM	8,12*	5911,99*	0,19*	0,25*	138,52*	172,96*	3,41*	1820,56*	2,82*	0,43*	695,31*
C.V. (%)	10,68	12,96	4,97	4,7	5,3	5,2	3,39	2,8	3,6	6,47	5,4

*Significativo a 5%.

QM = quadrado médio.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 5 - Severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da antracnose (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *C. lindemuthianum* e que receberam a aplicação (com) ou não (sem) de fungicida no experimento 2

Tratamentos	Sev (%)		AACPA		LAI		HLAI		LAD		HAD		HRI		HAA		RI		RUE		Prod (g/planta)	
	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com
Controle	2,89	1,06	73,74	28,05	1,96	2,07	1,91	2,04	54,34	57,92	52,85	57,23	16,47	16,75	421,6	429,4	15,48	15,62	0,18	0,38	6,5	13,16
KSi	1,19	0,72	47,36	19,32	2,00	2,14	1,97	2,13	55,30	59,02	54,36	58,24	16,73	17,54	428,2	446,3	15,67	16,39	0,20	0,44	7,35	16,41
Mo	1,71	1,13	55,18	28,82	2,58	2,76	2,51	2,72	69,94	74,59	68,38	73,66	18,64	19,33	471,2	487,8	17,68	18,35	0,17	0,46	6,64	18,77
KSi +Mo	1,43	0,46	37,72	12,26	2,76	3,06	2,72	3,05	76,48	83,76	75,40	83,34	18,81	20,06	479,4	506,5	17,89	19,10	0,18	0,52	7,36	21,88
QM	1,09*		745,89*		1,17*		1,16*		827,03*		833,69*		11,43*		6337,90*		12,58*		0,004*		20,37*	
C.V. (%)	12,16		13,79		4,4		4,1		5,2		5,1		2,8		2,8		3,0		4,3		3,9	

*Significativo a 5%.

QM = quadrado médio.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 6 - Quadrado médio das variáveis severidade (Sev), área abaixo da curva do progresso da doença (AACPA), índice de área foliar (LAI), índice de área foliar sadio (HLAI), duração da área foliar (LAD), duração da área sadia (HAD), radiação interceptada pela área sadia (HRI), absorção da área sadia (HAA), radiação interceptada (RI), uso eficiente da radiação (RUE) e produção de grãos (Prod) em plantas de feijoeiro (cv. Pérola) inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* experimento 2

Contrastes	Sev	AACPA	LAI	HLAI	LAD	HAD	HRI	HAA	RI	RUE	Prod (g/planta)
-KSi vs. +KSi	1,31**	924,0*	0.06 ^{ns}	0.009 ^{ns}	3,17 ^{ns}	4,75 ^{ns}	0.83 ^{ns}	418,6*	0,68 ^{ns}	0,004**	8,68*
-Mo vs. +Mo	0,79**	237,2*	0.79**	1,28**	781,01**	765,92**	17,0**	8744,4**	18,1**	0.003**	19,076**
-KSi-Mo vs. +KSi+Mo	3,19**	2012,4**	1.40**	2,39**	1775,60**	1775,60**	23,90**	13665,3**	102,0**	0.013**	59,56*

** Significativo pelo teste de F a 1%.

* Significativo pelo teste de F a 5%.

No segundo experimento, a severidade e a AACPA decresceram significativamente em 39,18% e 58,67% com a aplicação de fungicida (Tabela 4). Os tratamentos KSi, Mo e KSi+Mo diminuíram significativamente a severidade em 51,61%; 27,7%; e 52,11%, respectivamente, e a AACPA em 34,48%; 17,47%; e 50,89%, respectivamente (Tabelas 5 e 6). A produção de grãos foi 61,18% maior nas plantas que receberam fungicida em relação às do tratamento-controle (Tabela 4). Os tratamentos KSi, Mo e KSi+Mo aumentaram significativamente a produção de grãos em 16,78%; 25,71%; e 44,71%, respectivamente (Tabelas 5 e 6).

Variáveis integrais: no primeiro experimento, houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos sem e com a aplicação de fungicida, para as variáveis LAD e HAD. A pulverização com fungicida aumentou a LAD e a HAD em 8,78% e 11,18%, respectivamente (Tabela 1). O tratamento KSi não afetou as variáveis LAD e HAD. Os tratamentos Mo e KSi+Mo aumentaram LAD em 29,66% e 39,05%, respectivamente, e HAD em 32,85% e 42,85% respectivamente (Tabelas 2 e 3). Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos sem e com a aplicação de fungicida, para as variáveis RI e HRI. O fungicida aumentou a RI em 4,15% e a HRI em 5,37% (Tabela 1). O tratamento KSi não afetou a RI. Os tratamentos Mo e KSi+Mo aumentaram significativamente ($P \leq 0,05$) a RI em 10,08% e 11,24%, respectivamente. Os tratamentos KSi, Mo e KSi+Mo incrementaram significativamente a HRI em 3,13%; 10,69% e 13,34%, respectivamente (Tabelas 2 e 3). O fungicida aumentou a HAA e o RUE em 5,40% e 135,71%, respectivamente (Tabela 1). Os tratamentos KSi, Mo e KSi+Mo incrementaram significativamente a HAA em 2,81%; 10,92%; e 13,46%, respectivamente. O tratamento KSi não afetou a RUE. Os tratamentos Mo e KSi+Mo aumentaram a RUE em 1,54% e 30,55%, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

No segundo experimento, o tratamento fungicida aumentou a LAD e a HAD em 7,50% e 8,55%, respectivamente (Tabela 4). O tratamento KSi não afetou a LAD e a HAD. Os tratamentos Mo e de KSi+Mo incrementaram a LAD em 28,72% e 42,73% e a HAD em 29,03% e 44,20%, respectivamente (Tabelas 5 e 6). O tratamento fungicida aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) a RI em 4,10% e a HRI em 427% (Tabela 4). O tratamento KSi não afetou as variáveis RI e HRI; com Mo e KSi+Mo, incrementou-se significativamente a RI em 15,81% e 18,90%, respectivamente; e com NaMo e de KSi+NaMo, aumentou-se significativamente a

HRI em 14,32% e 16,97%, respectivamente (Tabelas 5 e 6). Já o fungicida aumentou a HAA e a RUE em 3,86% e 146,1%, respectivamente (Tabela 4); o tratamento KSi não afetou a HAA, enquanto com Mo e KSi+Mo aumentou-a em 12,69% e 15,92%, respectivamente; com KSi, Mo e KSi+Mo, elevou-se significativamente a RUE em 13,02%; 11,26% e 23,59%, respectivamente (Tabelas 5 e 6).

DISCUSSÃO

A aplicação foliar de KSi e de molibdato de sódio poderia oferecer alternativa viável e importante para o controle da antracnose ou como suplemento ao uso de fungicidas. Este trabalho apresenta uma das primeiras evidências de que a pulverização foliar de KSi em associação com o molibdato de sódio diminuiu a intensidade da antracnose e aumentou a produção de grãos com maior eficiência do que a pulverização isolada de cada um desses produtos. A aplicação foliar de KSi em associação com o molibdato de sódio contribuiu para reduzir a AACPA, que expressa informações quantitativas do efeito da resistência do hospedeiro na diminuição da intensidade da doença (Jeger e Rollinson, 2001). Doenças de importância econômica em culturas como arroz, centeio, cevada, milho, morango, pepino, soja, sorgo, trigo e uva foram eficientemente controladas pelo fornecimento de Si no solo ou em cultura hidropônica (Bélanger et al., 2003; Datnoff et al., 2007; Dallagnol et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). Há alguns relatos do possível envolvimento do Mo no controle de doenças em tomateiro e feijoeiro (Dutta e Bremmer, 1981; Jesus et al., 2004; Miller e Becker, 1983).

A aplicação foliar de KSi constitui alternativa de uso em culturas como o feijoeiro com menor capacidade de absorção e translocação desse elemento que as gramíneas (Ma et al., 2001), enquanto a aplicação de Mo poderia agir no controle direto do patógeno, além de incrementar a produção de grãos na cultura do feijoeiro. Há pouca informação disponível sob o efeito da aplicação foliar do KSi em associação com o molibdato de sódio no controle das doenças do feijoeiro.

Os resultados indicaram redução significativa na AACPA com a aplicação foliar de KSi. De forma similar, Moraes et al. (2005) observaram queda de 62,4% na AACPA com a aplicação foliar de silicato de sódio em plantas de feijoeiro. A pulverização de KSi com pH 5 e 10 diminuiu a severidade da mancha-angular em

42% e 30%, respectivamente (Rodrigues et al., 2010). A aplicação foliar de KSi resultou em controle satisfatório da antracnose em razão, provavelmente, da formação de barreira física como resultado da deposição do Si na superfície foliar ou do efeito osmótico do silicato aplicado, mas não pelo aumento na atividade das enzimas envolvidas na resposta de defesa do hospedeiro ao ataque dos patógenos. Guevel et al. (2007) mostraram que a aplicação foliar de Si foi menos eficiente no controle do míldio pulverulento em plantas de trigo que a aplicação radicular. A redução na severidade da doença com a aplicação foliar de Si foi devida ao efeito direto do sal de Si sobre o patógeno em vez de efeito mediado pela planta, como é o caso da adubação radicular, que resulta em ótimo efeito profilático devido à deposição do Si, formando uma capa subcuticular nos tecidos foliares, e à potencialização de enzimas e compostos de defesa do hospedeiro. No caso da pulverização com KSi, o contato do conídio com a solução do produto pode afetar a viabilidade do conídio ou o crescimento do tubo germinativo do fungo, como também a penetração de *C. lindemuthianum* pelo impedimento físico devido à secagem do produto no tecido foliar, o que interfere no ingresso do patógeno, diminuindo a intensidade da antracnose. De fato, os ciclos secundários do patógeno podem diminuir, reduzindo a taxa do progresso da epidemia (Parlevliet, 1979). Menzies et al. (1992) observaram que a aplicação foliar de KSi em pepino, melão e abóbora diminuiu o número de colônias de *Podosphaeria xanthii* e decresceu a severidade do míldio pulverulento.

A pulverização com KSi não teve efeito significativo nas variáveis LAI, HLAI, LAD e HAD devido à baixa translocação do Si nas folhas das plantas. Dentro desse contexto, o fornecimento de KSi via adubação foliar estaria relacionado com a redução da intensidade da doença pelo efeito direto sobre o desenvolvimento do patógeno e não com o crescimento do feijoeiro. Bowen et al. (2002) relataram que camadas de KSi cobrindo a cutícula foliar da videira impediram a germinação e a penetração dos ascósporos de *Uncinula necator*, diferentemente das áreas da folha que não foram cobertas, onde o fungo se desenvolveu mais significativamente. A pulverização foliar de KSi aumentou a produção de grãos, o que corrobora os resultados de Rodrigues et al. (2010), que obtiveram aumento na produção de grão de feijão em 30% e 43% com a aplicação foliar de KSi. Esse incremento pode ser atribuído ao decréscimo na intensidade da doença.

O molibdato de sódio contribuiu para aumentar as variáveis LAI, HLAI, LAD, HAD, RI, HRI, HAA e RUE e, por conseguinte, a produção de grãos de feijão. O ganho em produção devido à aplicação de Mo deve-se à importância desse micronutriente na atividade da nitrato redutase e nitrogenase, ambas envolvidas com a fixação do nitrogênio (Dechen et al., 1991). Jesus et al. (2004) reportaram incremento próximo de 17% na produção de grãos pela aplicação de molibdato de sódio em plantas de feijoeiro infectadas com mancha-angular. O incremento na produção foi atribuído à diminuição na severidade da doença, assim como também ao efeito do Mo como micronutriente, já que este tem participação positiva no metabolismo do nitrogênio e, conseqüentemente, aumenta a produção de matéria seca da planta (Vieira et al., 1992; Rodrigues et al., 1996).

A pulverização de molibdato de sódio diminuiu a severidade da antracnose e a AACPA em razão, provavelmente, de seu efeito direto sobre *C. lindemuthianum*. Isso graças às suas propriedades tóxicas, como metal pesado, agindo na desnaturalização de macromoléculas de importância biológica como as proteínas, toxinas e enzimas do patógeno (Graham e Stangoulis, 2007). O efeito tóxico do Mo na conformação das proteínas poderia explicar a redução da quantidade de zoósporos viáveis de *Phytophthora* sp. (Halsall, 1977). Dessa maneira, o contato do conídio de *C. lindemuthianum* com a solução de molibdato de sódio pode afetar a viabilidade, crescimento e penetração do conídio, diminuindo a intensidade da antracnose pela redução da taxa de progresso da doença e dos ciclos secundários da antracnose. As enzimas dependentes do Mo (molibdoenzimas) estão também envolvidas na síntese dos fitormonas ácido abscísico (ABA) e ácido indole-3-acético (IAA). A enzima aldeído oxigenase (AO) dependente do Mo catalisa as etapas finais da conversão do indol-3- acetaldeído (IAA) e a oxidação de aldeído abscísico para ABA (Kaiser et al., 2005). Mutações tanto na apoproteína AO quanto nas enzimas envolvidas na biossínteses Moco e ativação do Moco interromperam a síntese de ABA (Hesberg et al., 2004). Diminuição nos conteúdos de ABA nas células vegetais resultou em plantas com aparência de murchas devido à transpiração excessiva e à perda de controle dos estômatos, à dormência das sementes alterada e às respostas de defesa prejudicadas (Mendel e Haensch, 2002). Conseqüentemente, o Mo na planta tem também papel fundamental nas relações hídricas e nas taxas de transpiração através dos estômatos e do controle das respostas relacionadas ao estresse.

O fungicida diminuiu a AACPA e aumentou a produção de grãos em virtude, em certa parte, do aumento da RUE. A aplicação de KSi em associação com o molibdato de sódio reduziu a AACPA e a aumentou a produção de grãos em razão, possivelmente, dos maiores valores das variáveis relacionadas com a área foliar, à exceção da RUE. Porém, o controle da doença foi inferior ao fornecido pelas ações preventivas, curativas e antiesporulantes do fungicida.

Os métodos utilizados para proteger culturas economicamente importantes como o feijoeiro contra a infecção por *C. lindemuthianum* concentram-se principalmente no uso de cultivares resistentes e na aplicação de fungicidas. Os resultados deste trabalho apontaram para a possibilidade de se utilizar a aplicação foliar de KSi em associação com o molibdato de sódio, para aumentar a resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum* e, conseqüentemente, obter ganho na produção de grãos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ademir MAF, De castro JL, Akira M, Goto JC. (2005) Ação fungicida do acaricida azocyclotin sobre a antracnose do feijoeiro comum *Bragantia* **64**:241-248.

Araújo E. (1988) Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) a infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Saa E Magn) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.

Bailey JA, O'Connell RJ, Pring RJ, Nash C.(1992) Infection strategy of *Colletotrichum* species. In: Bailey JA, Jeger MJ (eds) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 88-120.

Bastiaans L. (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* **81**:611-615.

Bélanger RR, Benhamou N, Menzies JG. (2003) Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology* **93**:402-412.

Bergamin Filho A, Carneiro SMTP, Godoy CV, Amorim L, Berger RD, Hau B. (1997) Angular leaf spot of *Phaseolus* beans: relationships between disease, healthy leaf area, and yield. *Phytopathology* **87**: 506-515.

Bowen PJ, Menzies J, Ehret D. (1992) Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *J Amer Soc Hort Sci* **117**:906-912.

Carver TLW, Zeyen RJ, Ahlstrand GG. (1987) The relationship between insoluble silicon and success or failure of attempted primary penetration by powdery mildew (*Erysiphe graminis*) germlings on barley. *Physiol Mol Plant Pathol* **31**:133-48.

Daamen RA, Jorritsma ITM. (1990) Effects of powdery mildew and weather on winter wheat yield. 2. Effects of mildew epidemics. *Neth. J. Plant. Pathol* **96**:35-46.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* **99**:116-121.

Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW. (2007) Silicon and Plant Disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 233-246.

Dechen AR, Haag HP, Carmello QAC. (1991) Funções de Micronutrientes nas Plantas. In: Ferreira ME, Cruz MCP. (eds.). *Micronutrientes na Agricultura*. Piracicaba: POTAFOS/CNPq, pp 65-78.

Dutta BK, Bremmer E. (1981) Trace elements as plant chemo therapeutants to control *Verticillium* wilt. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **88**:405-412.

Epstein E. (1999) Silicon. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:641-64.

Fauteux F, Remus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR. (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* **249**:1-6.

Godoy CV, Carneiro SM, Lamauti MT, Pria MD, Amorim L, Berger RD, Filho AB. (1997) Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **104**:336-345.

Gong HJ, Zhun X, Chen K, Wang S, Zhang C. (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in post under drought. *Plant Sci* **169**:313-321.

Graham RD, Stangouli JCR (2007). Molybdenum and Plant Disease. In: Datnoff L, Elmer WH, Huber DM (eds). *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 203-205.

Guevel MH, Menzies JG, Belanger RR. (2007) Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. *Eur J Plan Pathol* **119**:429-436.

Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S, Pilbeam DJ. (2007) Silicon mediates changes to some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach (*Spinacia oleraceae* L.) grown under B toxicity. *Sci Hortic* **113**:113-119.

Gupta UC, Lipsett J. (1981) Molybdenum in soil, plant and animals. *Adv Agron* **34**:73-115.

Halsall, DM. (1977) Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores: II. Effects of copper, boron, cobalt, manganese, molybdenum and zinc ions. *Can J Microbiol* **23**:1002-1010.

Haque MS, Mukhopadhyaya MC. (1983) Influence of some micronutrients on *Rotylenchus reniformis*. *Indian J Nematol* **13**:115-116.

Hattori T, Inanaga S, Araki HP, Morita S, Luxova M, Lux A. (2005) Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiol Plant* **123**:459-466.

Hesberg C, Haensch R, Mendel RR, Bittner F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine deshydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**:13547-13554.

James WC.(1974) Assessment of plant diseases and losses. *Annu Rev Phytopathol* **12**:27-48.

Jeger MJ, Viljanen-Rollinson SLH. (2001) The use of the area under the disease progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* **102**:32-40.

Jesus WC, Vale FXR, Coelho RR, Hau B, Zambolim L, Berger RD. (2004) Management of angular leaf spot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with molybdenum and fungicide. *Agron J* **96**:665-670.

Johnson KB. (1987) Defoliation disease and growth: a reply. *Phytopathology* **77**:1495-1497.

Kaiser B, Gridley K, Brady JN, Phillips T, Tyerman SD. (2005) The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann Bot* **96**:745-756.

Kranz J. (1988). Measuring plant disease. In Kranz, J. & Rotem, J. (eds). *Experimental techniques in plant disease epidemiology*. Heidelberg, Springer, pp 35-50.

Kim SG, Kim KW, Park EW, Choi D. (2002) Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves, a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology* **92**:1095-1103.

Liang YC, Hua H, Zhu YG, Zhang J, Cheng C, Romheld V. (2006) Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. *New Phytol* **172**: 63-72.

Lopes DB, Berger RD. (2001) The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. *Phytopathology* **91**:212-220.

Ma JF, Miyake Y, Takahashi E. (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff (eds). *Silicon on Agriculture*, pp 17-39.

Marschner H. (1988) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2a ed., San Diego: Academic Press, pp 436-460.

Marschner, H. 1986. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.

Mendel RR, Haensch R. (2002) Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J Expl Bot* **53**:1689-1698.

Menzies JP, Bowen DL, Glass ADM. (1992). Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. *J Am Soc Horti. Sci* **117**:902-905.

Monteith JL. (1972) Solar radiation and productivity in tropical ecosystems. *J Appl Ecol* **9**:746-747.

Moraes SRG, Pozza EA, Alves E, Pozza AAA, Carvalho JG, Lima PH, Botelho AO. (2005) Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. *Fitopatol Bras* **31**:69-75.

Nunes WMC, Bergamin Filho A (1996). Avaliação dos danos causados pela antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro. *Fitopatol Bras* **21**:436-442.

Oliveira S.F. (2003) Novos fungicidas e programas de pulverização para o controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro. *Summa Phytopathol* **29**:45-48.

Pastor-Corrales M. (1985) Enfermedades del frijol causadas por hongos. in: López, Fernández, & Schoonhoven, (eds). FRIJOL: Investigación y Producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 172-180.

Parlevliet JE. (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu Rev Phytopathol* **17**:203-222.

Pengelly BC, Blamey FPC, Muchow RC. (1999) Radiation interception and accumulation of biomass and nitrogen by soybean and three tropical annual forage legumes. *Field Crops Research* **63**:99-112.

Pinnschmidt HO, Teng PS, Young L. (1994) Methodology for quantifying rice yield effects of blast. In: Zeigler RS, Leong SA, Teng PS. (eds) Rice Blast Disease. Wallingford, CAB. International, pp 381-408

Pria MD; Silva OC; Costa JLS; Souza EDT; Berni RF. (1999) Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico In: Canteri MG, Pria M.D, Silva OC. (eds).Ponta Grossa, pp.17-34.

Mendel RR. (2005) Biology of the molybdenum cofactor. *J Exp Bot* **58**:2289-2296

Rava CA, Purchio AF, Sartorato A. (1994) Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatol Bras* **19**:167-172.

Rodrigues JRM, Andrade MJB, Carvalho JG. (1996) Resposta de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) a doses de molibdênio aplicadas via foliar. Ciênc. Agrotec. **20**:323-333.

Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon. *Phytopathology* **93**:535-546.

Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA. (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* **66**:144-159.

Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndörfer GH, Zambolin L. (2009) Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Austral Plant Pathol* **38**:366-372.

Rodrigues FA, Duarte HSS, Rezende DC, Wordell Filho JA, Kornodorfer GH, Zambolin L. (2010) Foliar spray of potassium silicate on the control of angular leaf spot on beans. *J plant nutr* **33**:2082-2093.

Shaner G, Finney RE. (1977) The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox wheat. *Phytopathology* **67**:1051-1055.

Sinclair TR, Muchow RC. (1999) Radiation use efficiency. *Adv Agron* **65**:215-265.

Singh S, Pastor-Corrales MA, Molina A, Otoyá M. (1992) Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Doc. De Trabajo No. 113. M. Pastor-Corrales (ed). CIAT, Cali, pp 198-211.

Subba Rao KV, Yang XB, Berggren GT, Snow JP. (1989) A multiple regression model to estimate the contributions of leaves and the effects of leaf rust on yield of winter wheat. *Phytopathology* **79**:1233-1238.

Taiz, L, Zeiger E. (1998) Plant physiology. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Vieira C. (1988) Doenças e Pragas do Feijoeiro. 2nd. Ed. Viçosa. MG. Imprensa Universitária.

Vieira C, Nogueira AO, Araujo A. (1992) Adubação nitro genada e molibdica na cultura do feijão. *Rev Agríc (Piracicaba Braz.)* **67**:117–124.

Waggoner PE, Berger RD. (1987) Defoliation, disease, and growth. *Phytopathology* **77**:393-398.

Watson DJ. (1947) Comparative physiological studies on the growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. *Ann Bot* **41**:41-76.

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

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) A maior concentração foliar de Si aumentou o período de incubação, diminuiu a severidade final e a área abaixo da curva de progresso da antracnose.
- 2) A potencialização da defesa das plantas de feijoeiro supridas com Si à antracnose foi associada com a participação das enzimas fenilalanina amônia-liase, lipoxigenases, quitinases e maior concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico.
- 3) Plantas de feijoeiro supridas com Si apresentaram incremento na taxa de assimilação de CO₂. Além disso, mostrou maior proteção da clorofila total e carotenoides, menor produção de peróxido de hidrogênio, incremento na atividade das enzimas ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e redutase da glutathione, contribuindo para o melhor desempenho fisiológico das plantas, mesmo quando infectadas por *C. lindemuthianum*.
- 4) Plantas pulverizadas com silicato de potássio apresentaram redução da severidade final e da área abaixo da curva do progresso da antracnose. A aplicação de molibdato de sódio aumentou a matéria seca das plantas de feijoeiro mais do que quando foram pulverizadas com fungicida. A aplicação de silicato de potássio em combinação com o molibdato de sódio reduziu a intensidade da antracnose e aumentou a produção de grãos.