

GISELE PEREIRA DOMICIANO

EFEITO DO SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO DA MANCHA MARROM DO
TRIGO: COMPONENTES DE RESISTÊNCIA E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

T

D669e
2008

Domiciano, Gisele Pereira, 1982-

Efeito do silício no desenvolvimento da mancha marrom do trigo: componentes de resistência e respostas fisiológicas e bioquímicas / Gisele Pereira Domiciano.

– Viçosa, MG, 2008.

xi, 49f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Xavier Ribeiro do Vale.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-49.

1. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos fisiológicos.
 2. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos bioquímicos.
 3. Trigo - Efeito do silício. 4. *Bipolaris sorokiniana*.
 5. Epidemiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

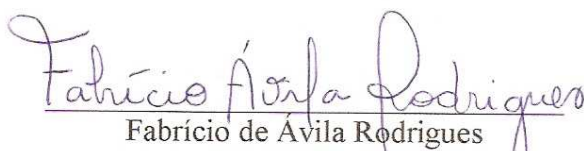
CDD 22.ed. 632.456

GISELE PEREIRA DOMICIANO

EFEITO DO SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO DA MANCHA MARROM DO
TRIGO: COMPONENTES DE RESISTÊNCIA E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS.

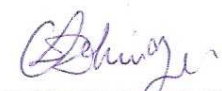
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2008.


Fabrício de Ávila Rodrigues
(Co-orientador)


Waldir Cintra de Jesus Junior
(Co-orientador)


Olinto Liparini Pereira


Onkar Dev Dhingra


Francisco Xavier Ribeiro do Vale
(Orientador)

À Deus.
Aos meus pais, Delvair e Maria,
A minha irmã Karyne,
e ao Alexandre.
Por todo amor, por quem sou e por
Tudo que alcancei.

DEDICO

BIOGRAFIA

GISELE PEREIRA DOMICIANO, filha de Delvair Domiciano de Miranda e Maria das Graças Pereira Domiciano, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, em 22 de fevereiro de 1982. Em fevereiro de 2000, ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa graduando-se em julho de 2005. Em maio de 2006 ingressou no curso de mestrado em Fitopatologia na mesma instituição, submetendo-se a defesa de tese em fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (o CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

Ao professor Francisco Xavier Ribeiro do Vale, pela amizade, incentivo e pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues, pela amizade, auxílio e sugestões durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Waldir Cintra de Jesus Junior, Olinto Liparini Pereira e Onkar Dev Dhingra, pelas sugestões e críticas apresentadas e pela disponibilidade em participar da banca de defesa dessa dissertação.

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

Ao Antônio Joaquim Macabeu pela amizade, pela ajuda e pelo compartilhamento de sua experiência durante esses anos de convívio.

Aos companheiros de Fitopatologia, Hyana Lima, Lila Xavier, André Duarte e Alexandre Capucho, pela amizade, pelo auxílio e pelo convívio agradável.

A Vivian pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Epidemiologia, Jéssica Shmidt, Max Lenine e Cristian Alves pela amizade e boa convivência durante esses anos.

A todos os colegas do Laboratório Interação Planta- Patógeno, pela amizade e pelo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Jésus Maciel, Camilo de Lelis, Bruno, Rita, Braz Martins, Eloy e Délio Duarte.

Aos meus pais, Delvair e Maria das Graças e a minha irmã Karyne, pelo carinho, apoio, ajuda, confiança e pelo referencial de dedicação, honestidade e perseverança.

Ao Alexandre pelo apoio constante, dedicação e amor.

Aos estudantes Henrique Oliveira, Wiler Ribas, Patrícia Cardino e Camila Andrade pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Professor Gaspar H. Korndörfer da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela realização das análises da concentração foliar de silício e ao professor Gilberto F. Corrêa por indicar a classe de solo usada nesse estudo.

A Sandra Cerqueira, pela amizade e ajuda na determinação da atividade enzimática.

Ao Professor Richard Bélanger do Departamento de Fitopatologia da Université Laval (Sainte-Foy, Québec, Canadá) pela realização das microanálises de raios-X.

A Professora Maria Goretti de Almeida Oliveira e ao Prof. Reginaldo S. Romeiro por disponibilizar a utilização de alguns equipamentos em seus laboratórios.

A EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão) pelo envio das sementes de trigo usadas neste trabalho.

À Deus, pela minha vida, pela saúde, força, coragem e pelas oportunidades que tem me proporcionado durante todo o decorrer da minha vida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Mancha marrom	3
2.2 Silício no controle de doenças	4
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Material de Solo	9
3.2 Fonte, doses de silício e adubação de plantas de trigo	9
3.3 Cultivares de trigo e inoculação das plantas	10
3.4 Análise da concentração foliar de silício e cálcio (Ca) no material vegetal	11
3.5 Microanálise de raios-X para determinar a deposição de silício em folhas de trigo	12
3.6 Quantificação dos componentes de resistência	12
3.6.1 Período de incubação (PI)	13
3.6.2 Severidade da mancha marrom e área abaixo da curva de progresso	13
3.6.3 Número de lesões (NL) por cm ² de área foliar	13
3.6.4 Tamanho médio de lesão (TML)	13
3.6.5 Avaliação da severidade da mancha marrom utilizando-se o programa QUANT 1.0	13
3.7 Avaliação da taxa fotossintética (TF) em folhas de plantas de trigo	14
3.8 Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos	14
3.8.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST)	14
3.8.2 Determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG)	15
3.9 Determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa de plantas a patógenos	16
3.9.1 Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)	16
3.9.2 Polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1)	17
3.9.3 Quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)	17
3.9.4 Determinação da concentração total de proteínas	18
3.10 Delineamento experimental e análise estatística	18
4 RESULTADOS	20
4.1 Concentração foliar de Cálcio e Silício	20
4.2 Microanálise de raios-X para determinar a deposição de silício em folhas de trigo	20
4.3 Sintomas da mancha marrom em plantas de trigo supridas ou não com silício	21
4.4 Efeito do Si nos componentes de resistência	22
4.4.1 Período de incubação (PI)	22
4.4.2 Progresso da mancha marrom e AACPM	22
4.4.3 Tamanho médio de lesão	23
4.4.4 Número de lesões (NL) por cm ² de área foliar	23

4.4.5	Progresso da mancha marrom na folha bandeira e AACPMM na folha bandeira	24
4.4.6	Severidade final da mancha marrom.....	25
4.4.7	Severidade real estimada pelo QUANT	25
4.5	Análise de correlação de Pearson.....	26
4.6	Taxa fotossintética em folhas de plantas de trigo	27
4.7	Concentração de CFST	28
4.8	Derivados da LATG.....	29
4.9	Atividade de enzimas relacionadas com a defesa de plantas à patógenos .	30
4.9.1	Quitinases.....	30
4.9.2	Peroxidases.....	31
4.9.3	Polifenoloxidasas	31
5	DISCUSSÃO	33
	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

Domiciano, Gisele Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Efeito do silício no desenvolvimento da mancha marrom do trigo: componentes de resistência e respostas fisiológicas e bioquímicas.** Orientador: Francisco Xavier Ribeiro do Vale. Co-orientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Waldir Cintra Junior de Jesus.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito do silício (Si) em alguns componentes de resistência de plantas de trigo à mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* bem como, respostas fisiológicas e bioquímicas potencializadas por esse elemento. Para isso, plantas das cultivares de trigo, BR-18 e BRS-208 foram crescidas em vasos contendo 0 e 0,30 g Si/kg de solo e inoculadas aos 45 dias após emergência com *B. sorokiniana*. Foram avaliados os componentes de resistência: período de incubação (PI), número médio de lesões por cm² de área foliar (NL), tamanho médio de lesão (TML) e área abaixo da curva do progresso da mancha marrom (AACPM). Para avaliar se o Si poderia potencializar respostas fisiológicas e bioquímicas mensurou-se a taxa fotossintética (TF), a concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST), a concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG), e a atividade das enzimas quitinases (QUI), peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PFO). Neste estudo verificou-se que a concentração foliar de Si foi 90,5% superior em plantas supridas com esse elemento em relação às plantas não supridas com Si. Nas folhas das plantas supridas com Si foi observado grande deposição de Si em ambas as cultivares por meio de microanálise de raios-X. Nessas plantas, o PI foi prolongado em cerca de 10 h, possivelmente pelo impedimento físico à penetração do fungo oriundo da deposição desse elemento na superfície foliar. Verificou-se também que em plantas supridas com Si este elemento reduziu o NML, o TML e a AACPM em 38%, 58% e 62%, respectivamente, em relação a plantas não supridas com Si. Além disso, as concentrações foliares de Si correlacionaram-se positivamente com o PI ($r = 0,62$) e negativamente com a AACPM e o TML ($r = -0,57$ e $-0,70$, respectivamente). Os componentes de resistência de plantas supridas com Si e inoculadas com *B. sorokiniana* foram diferentes daqueles mensurados em plantas inoculadas e não supridas com esse elemento. Como houve variação apenas desse elemento nos experimentos podemos concluir que o Si aumentou a resistência de plantas de trigo à mancha marrom. A TF foi reduzida nas folhas bandeira e em folhas abaixo da folha bandeira das plantas das

duas cultivares de trigo a partir de 48 horas após a inoculação (HAI). Porém, em plantas supridas com Si a TF manteve-se mais elevada no decorrer das avaliações, possivelmente devido a menor severidade da mancha marrom nessas plantas. Alterações na produção de CFST e na concentração dos derivados da LATG também foram observadas. Apesar da produção de CFST ter oscilado, esta foi significativamente menor em folhas de plantas supridas com Si durante o período amostrado. Mas é pouco provável que tenha contribuído para aumentar a resistência do trigo à mancha marrom. Entretanto, na presença de Si, o decréscimo na concentração de CFST, em plantas supridas com Si, foi acompanhado com aumento na LATG e decréscimo na severidade da mancha marrom. Altas concentrações de LATG em plantas inoculadas e supridas com Si podem ter contribuído para aumento no nível de resistência das cultivares de trigo à mancha marrom. A atividade das QUI foi significativamente maior em plantas de ambas as cultivares supridas com Si a partir das 48 HAI. A atividade da POX foi maior apenas em plantas da cultivar BRS-208 supridas com Si. Uma vez que plantas supridas com esse elemento apresentaram baixa severidade da doença a maior atividade das enzimas QUI e POX podendo indicar a participação dessas enzimas na defesa de plantas de trigo à mancha marrom. PFO, entretanto não teve sua atividade alterada em plantas supridas ou não com Si. Dos resultados deste estudo resultam as primeiras evidências de que o Si afeta a severidade da mancha marrom pela alteração de alguns componentes de resistência e pela potencialização de repostas de defesa fisiológicas e bioquímicas. Dessa forma, o Si tem grande potencial para ser usado como medida no manejo da mancha marrom do trigo no futuro.

ABSTRACT

Domiciano, Gisele Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008.
Silicon effect on brown leaf spot development: resistance components and physiological and biochemical responses. Advisor: Francisco Xavier Ribeiro do Vale. Co-advisors: Fabrício de Ávila Rodrigues and Waldir Cintra Junior de Jesus.

The objective of this work was to evaluate the effect of silicon (Si) in some resistance components of wheat plants against brown leaf spot (BLS), caused by *Bipolaris sorokiniana* as well as, physiological and biochemical defence responses induced by this element. To do so, plants of two wheat cultivars, BR-18 and BRS-208, were grown in pots containing 0 and 0.30 g Si/kg of soil and inoculated 45 days after emergency with *B. sorokiniana*. Incubation period (IP), mean lesion number by cm² of leaf area (MLN), mean lesion size (MLS) and the area under the disease progress curve (AUDPC) were measured to evaluate silicon effect on resistance components. Photosynthetic rate (PR), total soluble phenolic compounds concentration (TSPCC), lignin acid tioglycolic derivatives concentration (LATDC) and enzymatic activity of quitinases (QUI), peroxidases (POX) and polyphenoloxidase (POD) were measured to evaluate if silicon could induce physiological and biochemical responses. It was verified in this study that silicon concentration was 90,5% higher in plants supplied with this element in comparison with control plants. Moreover, it was observed a higher level of silicon deposition on leaves of both cultivars supplied with this element was revealed by means of X-rays microanalysis. In these plants the IP was prolonged in near 10h in silicon supplied plants, possibly due to physical blocking effect that this element have on fungus penetration. It was also verified that in plant supplied with silicon this element reduced the MLN, the MLS and the AUDPC in 30%, 58% and 68%, respectively, in comparison with control plants. And more, silicon concentrations correlated positively with IP ($r = 0.62$) and negatively with AUDPC and MLS ($r = -0.57$ and -0.70 , respectively). The resistance components of plants supplied with Si and inoculated with *B. sorokiniana* were different from those measured in plants inoculated e not supplied with this element. Since silicon was the only source of variation in the experiments it can be conclude that Si enhances resistance of wheat plants against spot brown. The PR was reduced in leaves and flag leaves of plants of both cultivars after 48 hours after inoculation (HAI). However, in plants supplied with silicon, the PR was kept higher during all evaluation, possibly due to low severity of BLS in these plants. Alterations

in TSPCC and LATDC due to silicon effect were also observed. Even though TSPCC oscillated a bit, it was significantly lower in leaf of silicon supplied plants during the evaluation time, although it's unlikely that it contributed for enhancing wheat resistance to BLS. However, in the presence of silicon the decrease in TSPCC was accompanied with increase of LATDC and decrease in BLS severity. Higher concentrations of LATD in plants supplied with silicon and inoculated with *B. sorokiniana*, may have contributed to enhancement of cultivars resistance against BLS. QUI activity was significantly enhanced in plants of both cultivars supplied with silicon after 48 HAI. POX activity was increased only in plants of cultivar BRS-208 supplied with silicon. Since plants supplied with silicon showed low BSP severity the high activity of QUI and POX may indicate that these enzymes participate in wheat defense against BLS. PFO activity, however, did not significantly change between plants supplied or not with silicon. The results of this study are first evidences that silicon affects BLS severity by altering wheat resistance components to BLS and by the potentialization of physiological and biochemical responses. Silicon has then, a great potential to be used as a BLS management measure in near future.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do trigo *Triticum aestivum* L. é de grande importância para a alimentação da população brasileira, o que reflete em sua área cultivada com 1,5 milhões de hectares em 2006 (Abitrigo, 2008). No entanto, em decorrência de vários fatores, entre eles a ocorrência de doenças, a produção nacional atende somente 27% do consumo interno. Dentre as principais doenças da cultura, destaca-se a mancha marrom, causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*. Atualmente, a maioria das cultivares de trigo é suscetível à mancha marrom, o que tem agravado os problemas decorrentes de epidemias dessa doença (Embrapa, 2007). O fungo *B. sorokiniana* infecta todos os órgãos das plantas de trigo, podendo causar danos de até 80% em regiões tritícolas mais quentes (Metha *et al.*, 1993; Wiese, 1987).

No Brasil, o melhoramento visando resistência à mancha marrom tem tido pouco sucesso (Reis & Casa, 2005) em função da natureza quantitativa da resistência (Sharma *et al.*, 2004) e da agressividade de *B. sorokiniana* (Kumar *et al.*, 2002). No entanto, a resistência das plantas às doenças, apesar de ser geneticamente controlada, pode ser influenciada por fatores ambientais. Nesse contexto, a nutrição mineral apresenta-se como o fator de maior facilidade de manipulação. De modo geral, plantas bem nutridas são menos vulneráveis a infecção por patógenos. Entretanto, alguns elementos têm papel direto em aumentar a resistência das plantas às doenças.

A severidade de importantes doenças em diversas culturas tem sido reduzida pela aplicação de silício (Si) (Bélanger *et al.*, 1995 e 2003; Datnoff *et al.*, 2007, Rodrigues *et al.*, 2001a). Particularmente em monocotiledôneas como o arroz, doenças fúngicas como a brusone (*Magnaporthe grisea*), a mancha parda (*Bipolaris oryzae*), a podridão do colmo (*Magnaporthe salvinii*) entre outras tiveram suas intensidades significativamente reduzidas pela aplicação de Si no solo (Datnoff *et al.*, 1991, Rodrigues *et al.*, 2001a, Seebold *et al.*, 2001). Em trigo o mildio pulverulento, (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) e a septoriose causada pelos fungos (*Septoria tritici* e *Septoria nodorum*) também tiveram sua severidade reduzida pela aplicação desse elemento (Rodgers-Gray & Shaw, 2000, 2004).

Vários são os efeitos benéficos do Si tais como o aumento do conteúdo de fósforo nos tecidos da planta, diminuição da transpiração, e o trigo assim como

outras gramíneas beneficia-se do Si no que tange ao aumento de resistência aos fitopatógenos. (Elawad & Green, 1979; Savant *et al.*, 1997).

Os mecanismos de resistência conferidos às plantas pelo Si quando atacadas por patógenos permanece em discussão pela comunidade científica. Do ponto de vista morfológico, acredita-se que o aumento da resistência esteja associado com a deposição e polimerização do Si abaixo da cutícula impedindo a penetração do fungo (Kim *et al.*, 2002). Entretanto, é possível que a resistência conferida pelo Si também ocorra através da ativação de mecanismos de defesa como já relatado no patossistema arroz-*Pyricularia grisea* (Rodrigues *et al.*, 2003, 2004, 2005).

Até o momento, informações na literatura sobre a resistência do trigo à mancha marrom mediada pelo Si são ausentes. Desse modo, o presente trabalho objetivou quantificar em plantas de trigo supridas ou não com Si, alguns componentes de resistência à mancha marrom. Foram estudadas também possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas relacionadas com a resistência do trigo à mancha marrom mediadas pelo Si.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mancha marrom

Para manter a sustentabilidade da cultura do trigo, os produtores passaram a adotar, há alguns anos, o sistema de plantio direto visando reduzir os impactos ambientais devido ao cultivo convencional (EMBRAPA, 2007). Contudo, dada à permanência dos restos culturais no campo, problemas decorrentes do ataque por patógenos têm se tornado freqüentes (Reis & Casa, 2005).

A mancha marrom, causada por *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechs. Ex Dast. (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc) Shoemaker), é uma das principais doenças do trigo no mundo, particularmente em regiões quentes da Ásia e da América do Sul (Mehta *et al.*, 1992; Reis & Casa, 2005). Nos últimos 20 anos, essa doença tem sido reconhecida por restringir o desenvolvimento do trigo em planícies ao leste do Sul da Ásia (Siddique *et al.*, 2006) e nas Américas, particularmente no Brasil (Mehta *et al.*, 1992).

Os sintomas da mancha marrom iniciam-se como pequenas lesões ovais com a 1 a 2 mm de comprimento, de coloração marrom-escuro a negra, sobre o limbo das primeiras folhas, em consequência da transmissão a partir de sementes (Wiese, 1987) e, posteriormente, nas demais folhas, bainhas e colmos. Essas lesões aumentam de tamanho e tornam-se elípticas com abundante esporulação. Devido à formação de numerosos conídios castanhos escuros, as lesões aparentam ser enegrecidas. Quando as lesões coalescem, o crestamento foliar ocorre e as folhas secam prematuramente (Dehne & Oerke, 1985; Metha, 1998). Contudo, estes não são os únicos sintomas. O fungo *B. sorokiniana* causa também podridões de raízes e pontos enegrecidos nos grãos. Mudanças infectadas desenvolvem lesões necróticas escuras nas raízes, coroas e nas bainhas das folhas baixas. Infecções na bainha e no limbo foliar desenvolvem-se na forma de manchas de formato oval a alongado de coloração marrom claro a marrom escuro (Kumar *et al.*, 2002). Infecções da coroa e da bainha podem ser tão severas que as plantas secam e não produzem grãos. Sob condições de temperaturas de 25°C e umidade relativa de 95 a 100%, por 48 horas, espiguetas podem ser afetadas, causando o não enchimento dos grãos (Kumar *et al.*, 2002).

A suscetibilidade de plantas de trigo ao patógeno aumenta perto do estágio de crescimento DC 56 (três quarto da inflorescência emergida) (Zadoks *et al.*,

1974). Nesse estágio, se as condições ambientais forem favoráveis, isto é, ocorrência de chuvas por um período de cinco a seis dias e temperatura média em torno de 20 a 30°C, a epidemia pode se desenvolver rapidamente (Metha, 1998). Sob condições de baixa intensidade luminosa, *B. sorokiniana* pode colonizar tecidos do hospedeiro de modo intercelular, sem ocasionar nenhum sintoma aparente (Kumar *et al.*, 2002).

Muito têm sido feito na tentativa de controlar *B. sorokiniana* em áreas quentes e úmidas, como no sudeste da Ásia e no Brasil (Siddique *et al.*, 2006). Nessas regiões, a mancha marrom tem se tornado preocupante, entretanto, nenhuma medida de controle tem se mostrado bem sucedida (Joshi *et al.*, 2004). Fungicidas têm sido utilizados, entretanto, a dificuldade reside em saber o momento ideal de aplicação, para se obter bons resultados (Picinini & Fernandes, 2001). Consequentemente, uma medida integrada de controle, utilizando a resistência genética como componente principal do sistema tem sido preconizada (Joshi & Chand, 2002). Na Ásia, por exemplo, a maioria das cultivares de trigo comercializadas são suscetíveis a mancha marrom (Siddique *et al.*, 2006).

A existência de germoplasmas com níveis adequados de resistência torna a resistência genética a melhor forma de controle. Mesmo tratando-se de resistência horizontal qualquer nível de resistência parcial pode ser medida complementar ao controle químico ou cultural (Joshi & Chand, 2002). No entanto, pouco progresso tem sido obtido com o melhoramento visando à resistência de cultivares de trigo à mancha marrom, devido à natureza quantitativa da herança, à variabilidade e à agressividade de *B. sorokiniana* (Duveiller *et al.*, 1998; Hetzler *et al.*, 1991). Além disso, existem poucas fontes de resistência genética a serem utilizadas em programas de melhoramento, tornado a incorporação da resistência uma tarefa difícil e de longo prazo.

2.2 Silício no controle de doenças

O silício (Si) é o segundo elemento mineral mais abundante no solo, perfazendo aproximadamente 28% da crosta terrestre (Elawad & Green, 1979).

Solos tropicais e subtropicais sujeitos ao intemperismo e a lixiviação, com cultivos sucessivos, tendem a apresentar baixos níveis de Si, devido a um processo conhecido como dessilisificação (Epstein, 1999). Embora o principal

reservatório desse mineral seja a fase sólida do solo, a fonte para a absorção imediata de Si pelas raízes das plantas é solução do solo.

Epstein (1999) demonstrou que o Si pode beneficiar as plantas de diferentes modos: aumentando a fotossíntese por manter as folhas eretas; reduzindo a toxicidade de metais pesados; reduzindo a transpiração cuticular e melhorando a eficiência no uso da água. Anormalidades quantitativas, como queda na produção, também têm sido relatadas em plantas de trigo desprovidas de Si (Rafi *et al.*, 1997). Tão significativa é o Si para as plantas e em tantas situações, que ele tem sido categorizado como um elemento quase-essencial (Epstein & Bloom, 2005).

Outro benefício atribuído ao Si é o aumento da resistência das plantas às diversas doenças com resultados promissores em vários patossistemas (Datnoff *et al.*, 2007). Em arroz, a brusone (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr), a mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi in Ito) Drechs ex Dastur), a podridão do colmo (*Magnaporthe salvinii* Catt.), a escaldadura (*Monographella albescens* Theum), a queima-das-bainhas (*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk) e a descoloração dos grãos (espécies de *Bipolaris*, *Fusarium*, entre outros fungos) tiveram suas intensidades significativamente reduzidas após a aplicação de Si no solo (Datnoff *et al.*, 1997; Savant *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2001, 2003 b).

Alguns estudos relatam que o Si retarda o progresso de doenças através do seu efeito sobre alguns componentes de resistência (Seebold *et al.*, 2001; Resende, 2007). A quantificação dos componentes de resistência fornece evidências sobre mecanismos de resistência da planta à fitopatógenos (Parlevliet, 1979). Os componentes de resistência que influenciam a taxa de progresso da doença incluem a frequência de infecção, o período latente, o tamanho das lesões, a produção de esporos (Parlevliet, 1979) e a taxa de expansão das lesões (Berger *et al.*, 1997).

O efeito do Si na restrição do parasitismo tem sido bem documentado, mas os mecanismos pelos quais esse elemento exerce suas propriedades profiláticas ainda não estão totalmente entendidos (Bélanger *et al.*, 2003). Yoshida (1962) sugeriu que a deposição e a polimerização do ácido monossilícico abaixo da cutícula forma uma dupla camada cutícula-sílica. Essa dupla camada cutícula-sílica pode dificultar a penetração de patógenos a exemplo de *P. grisea* em arroz

(Kim *et al.*, 2002). No entanto, é plausível também que esse elemento tenha um papel biologicamente ativo, potencializando mecanismos de defesa das plantas como, por exemplo, a produção de fitoalexinas e de proteínas relacionadas a patogênese (proteínas PR) (Fawe *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2004, 2005).

Rodrigues *et al.* (2003a) estudaram em nível ultraestrutural e citoquímico os eventos da patogênese, na interação arroz-*M. grisea*, com a aplicação de Si. Esses autores apresentaram as primeiras evidências citológicas de que o aumento na resistência do arroz à brusone, mediada pelo Si, foi devido ao acúmulo de compostos fenólicos. Observações ultraestruturais de folhas coletadas de plantas não supridas com Si revelaram que inúmeras células da epiderme e do mesófilo foram desprovidas de organelas funcionais, além de terem a parede celular completamente degradada por enzimas produzidas pelo fungo. A presença de material osmiofílico associado com células fúngicas foi raramente observada nas células da epiderme e do mesófilo. Em plantas supridas com Si, as hifas do fungo, presentes nas células da epiderme, do mesófilo e do sistema vascular ficaram vazias e foram circundadas por uma camada densa de material osmiofílico. Marcação citoquímica de quitina na parede das células do fungo não revelou nenhuma diferença no padrão de localização desse material nas amostras obtidas de plantas recebendo ou não Si no período de 96 horas após a inoculação com *M. grisea*. Isso indica que a produção de quitinases não foi um mecanismo de defesa importante. Por outro lado, a ocorrência de células fúngicas vazias circundadas por material amorfo em amostras de plantas supridas com Si sugere que compostos fenólicos ou fitoalexinas tiveram um papel crucial na resistência do arroz à brusone.

Em outro estudo, Rodrigues *et al.* (2004) testaram a hipótese de que uma alteração no desenvolvimento de *M. grisea*, nas células das folhas de arroz supridas com Si, poderia estar associada a um aumento na produção de fitoalexinas. Análise das cinco sub-frações (SF) da fração etil-éter obtida de extratos foliares de plantas de arroz supridas ou não com Si e inoculadas com *M. grisea* revelou que apenas a SF cinco apresentou atividade anti-fúngica contra *M. grisea*. A SF cinco de amostras provenientes de plantas supridas com Si foi mais tóxica contra o fungo do que a SF cinco de amostras provenientes de plantas não supridas com Si. Com base nessa informação, a SF cinco foi analisada por HPLC. Esse procedimento permitiu separar duas fitoalexinas caracterizadas como

momilactona A e B. Essas momilactonas foram induzidas em pequenas quantidades em plantas não inoculadas sem ocorrer nenhuma diferença entre plantas supridas ou não com Si. A indução dessas momilactonas foi, no entanto, 2,5 vezes maior em extratos de plantas supridas com Si e inoculadas com *M. grisea* do que nos extratos de plantas inoculadas não supridas com Si.

Embora pouco se conheça sobre como o Si aumenta a resistência do arroz a brusone, as hipóteses do impedimento físico e químico devem ser mutuamente consideradas. É possível que o Si, por ser um semi-metal, esteja potencializando os mecanismos de resistência do arroz as doenças, principalmente por atuar na rota metabólica dos fenilpropanóides, os quais podem exercer uma atividade antifúngica (Rodrigues *et al.*, 2005).

Existem também evidências de que o trigo, assim como o arroz, acumula Si de forma eficiente (Jarvis, 1987; Rafi & Epstein, 1999; Casey *et al.*, 2003). Rains *et al.* (2006) estudando a absorção de Si por plantas de trigo, corroboram as afirmativas feitas por Rafi & Epstein (1999) e Casey *et al.* (2003) de que a forma de absorção do Si pelo trigo é similar a observada em arroz, evidenciando que as diferenças restringem-se apenas na quantidade absorvida, sendo que em trigo a concentração de Si é bem menor do que em arroz.

Bélanger *et al.*, (2003) evidenciaram que a aplicação de solução nutritiva contendo Si às plantas de trigo promoveu proteção à penetração e a colonização de *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* através da deposição de papilas na parede celular. A matriz amorfa saturada de substâncias osmiofílicas ao redor da papila raramente foi penetrada pelo fungo, porém nos casos em que o fungo penetrou com sucesso, um material eletrofílico que reagiu positivamente com β -1-3 glucanos (constituintes da calose), recobriu a célula mãe do haustório restringindo assim o desenvolvimento normal do mesmo. Além disso, em plantas supridas com Si, houve acúmulo de compostos fenólicos os quais tiveram papel importante na resistência das plantas de trigo ao míldio pulverulento.

Rémus-Borel *et al.*, (2005) verificaram a existência de três compostos em trigo classificados como agliconas que apresentaram atividade antifúngica contra *B. g. f.sp. tritici*. Apesar de não terem determinado quais compostos antifúngicos são de fato potencializados pelo Si, os resultados apresentados por esses autores evidenciam que esse elemento pode atuar na potencialização de compostos

antifúngicos e não somente como uma barreira mecânica que evita a penetração pelo patógeno.

Além disso, plantas de pepino supridas com Si e inoculadas com *S. fuliginea* acumularam grandes quantidades de compostos fenólicos em suas células (Menzies *et al.*, 1991).

A exata natureza da interferência do Si solúvel com algumas rotas bioquímicas de resistência das plantas às doenças permanece desconhecida. Desse modo, visando um maior entendimento do papel do Si na planta, (Fauteux *et al.* 2006) realizaram análises da expressão gênica em plantas de *Arabidopsis thaliana* supridas ou não com Si e inoculadas ou não com *Erysiphe cichoracearum*. Esses autores observaram que em plantas inoculadas e tratadas com Si, a expressão dos genes envolvidos no metabolismo primário (relacionados à fotossíntese e vias energéticas) foi menos afetada do que em plantas não tratadas com Si, onde houve uma redução na expressão de muitos desses genes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos sob condições de casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, localizado na região da zona da mata de Minas Gerais, com latitude 20° 45' 14'' S e longitude 42° 52' 53'' W.

3.1 Material de Solo

Foram utilizados os primeiros 20 cm do perfil de um solo pertencente à classe Latossolo Amarelo ácrico típico (EMBRAPA, 1999), de textura argilosa, coletado no município de Uberlândia, Minas Gerais. Esta classe de solo foi escolhida por apresentar baixos teores estimados de Si disponíveis (11,8 mg/kg), natureza ácrica e elevado índice de intemperismo, características específicas de um solo deficiente em Si (Tabelas 1 e 2). As análises físicas e químicas do solo foram realizadas segundo metodologia descrita por Silva, (1999).

Tabela 1. Características físicas do material de solo na camada de 0 a 20 cm do Latossolo Amarelo ácrico típico.

Análise Granulométrica				
Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe Textural
dag/Kg-----				
34	6	7	53	Argiloso

Tabela 2. Características químicas do material de solo na camada de 0 a 20 cm do Latossolo Amarelo ácrico típico.

Análise Química													
pH	Si	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al ⁺	SB	T	T	V	m	M.O.
KCl	mg/Kg	--mg.dm ⁻³					cmol _c .dm ⁻³				-- % --		dag/Kg
4,8	11,8	0,5	13	0,1	0,0	0,0	3,8	0,1	0,2	3,9	2,0	40,5	2,3

3.2 Fonte, doses de silício e adubação de plantas de trigo

O produto comercial Vansil W-20 (volastonita, CaSiO₃) foi utilizado como fonte de Si por ser livre de contaminantes como o ferro e fósforo. Este produto foi adquirido da Empresa Ipiranga Comercial Química localizada em São Paulo. As características químicas desse produto são: poder relativo de neutralização total (PRNT) de 77%, teor total em SiO₂ de 51,9% (correspondendo a 24,2% de Si) e teor total em CaO de 43,4% (correspondendo a 31% de Ca). Foram usadas 0 e

1,25 g/kg volastonita correspondendo, respectivamente, a 0 e 0,30 g Si/kg de material de solo para a incubação do solo. Objetivando equilibrar a concentração de Ca presente em 1,25g/kg de volastonita, adicionou-se 0,967 g/kg de carbonato de cálcio (PRNT 100%, 40% Ca) no vaso que não recebeu volastonita. Com este procedimento, a concentração de Ca provenientes da volastonita e do carbonato de cálcio ficou padronizada em 0,387 g/vaso. Assim, apenas a concentração de Si variou entre os tratamentos.

A acidez do solo foi corrigida utilizando-se o silicato de cálcio e/ou carbonato de cálcio conforme descrito anteriormente, visando elevar a saturação de bases (V) a 30%. Em seguida, procedeu-se a incubação do solo em sacos plásticos por um período de trinta dias com a umidade mantida constante. Após esse período, foram coletadas amostras do solo para análise química (Tabela 3).

Tabela 3. Características químicas do material de solo determinadas após o período de incubação com as doses de volastonita e de carbonato de cálcio.

Volastonita	CaCO ₃	pH	P	K	Análise Química			H+Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	m
					Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺						
-----g/vaso-----		H ₂ O	-mg/dm ³ -		-----cmol _c /dm ³ -----						-----%		
0,00	0,967	6,2	1,1	9	1,19	0,0	0,0	3,7	1,21	1,21	4,91	24,6	0,0
1,25	0,000	5,8	1,1	9	1,00	0,0	0,0	4,0	1,02	1,02	5,02	20,3	0,0

A adubação do solo antes da semeadura foi feita aplicando-se 1,63g de fosfato de cálcio por kg de solo e, uma semana após a semeadura, foi fornecida às plantas 50 mL de solução nutritiva por vaso contendo 192 mg de KCl (cloreto de potássio), 104,42 mg de K₂SO₄ (sulfato de potássio), 150,35 mg de MgSO₄ (sulfato de magnésio), 61 mg de uréia, 0,27 mg de molibdato de amônio (NH₄MO₇O₂₄), 1,61 mg de ácido bórico (H₃BO₃), 6,67 mg de sulfato de zinco (ZnSO₄), 1,74 mg de sulfato de cobre (CuSO₄) e 4,10 mg de cloreto de magnésio (MgCl₂) e essa mesma solução, foi aplicada na segunda e na terceira semana após a semeadura.

3.3 Cultivares de trigo e inoculação das plantas

Sementes das cultivares BR-18 e BR- 208 foram cedidas pela EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Foram semeadas quatro sementes de cada cultivar de trigo por vaso devidamente desinfestadas em hipoclorito de

sódio 10% (v/v) e após a emergência, efetuou-se o desbaste, deixando-se apenas duas plantas por vaso.

Utilizou-se o isolado UFV *Bs-1* de *B. sorokiniana*, o qual foi obtido a partir de sementes de trigo infectadas com o patógeno. O isolamento desse fungo foi realizado seguindo-se o método direto (Dhingra & Sinclair, 1995) e preservado pelo método de grãos autoclavados (Metha, 1993). Um grão colonizado pelo fungo foi colocado para crescer em meio BDA. Após o crescimento, discos do meio de cultura BDA contendo o micélio do fungo foram retirados e distribuídos em placas com meio BDA para produção de conídios. Estas foram transferidas para câmara de crescimento, regulada para 25°C e fotoperíodo de 12 h onde permaneceram por 12 dias.

O inóculo foi preparado adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada contendo gelatina (1% p/v) em cada placa contendo o fungo em crescimento com posterior fricção com pincel de cerdas grossas para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada com gaze em tripla camada para retenção de micélio e fragmentos de ágar. Em seguida, a concentração foi ajustada para $2,5 \times 10^4$ conídios/mL por meio de um hemacitômetro. A suspensão foi preparada com gelatina para aumentar a aderência dos conídios na superfície foliar.

Aos 45 dias de idade [estádio de crescimento 45, (Zadoks 1974)], as plantas foram inoculadas aplicando-se 20 mL da suspensão de conídios com o auxílio de uma pistola pressurizada De Vilbiss nº15. Depois da inoculação, as plantas foram cobertas com sacos plásticos borrifados com água e em seguida, foram transferidas para câmara com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h (lâmpadas fluorescentes de 40 watts) onde permaneceram por 48 h. Após esse período, os sacos plásticos foram retirados e as plantas permaneceram na câmara de crescimento (umidade relativa de aproximadamente 70% e temperatura de 25°C) até o final das avaliações.

3.4 Análise da concentração foliar de silício e cálcio (Ca) no material vegetal

No final dos experimentos, as plantas de trigo, supridas ou não com Si, repetição, foram coletadas para determinação da concentração foliar de Si e Ca. O

material vegetal foi seco em estufa a 70°C até atingir o peso constante e, posteriormente, triturado em moinho tipo Wiley. A concentração foliar de Si foi determinada através da metodologia proposta por Korndörfer *et al.* (2004). A determinação da concentração de Ca foi por digestão nitroperclórica e espectrofotometria de absorção atômica (Silva *et al.*, 1999).

3.5 Microanálise de raios-X para determinar a deposição de silício em folhas de trigo

Fragmentos de folhas de aproximadamente 0,25 cm² (0,5 x 0,5 cm) foram coletados, ao acaso, das plantas de trigo de cada repetição das cultivares de trigo na presença e ausência de Si às 72 HAI com *B. sorokiniana*. Os fragmentos foram transferidos para frascos de vidro contendo 10 mL de fixativo (glutaraldeído 2,5% (vol/vol) preparado em tampão cacodilato de sódio (0,1M; pH 7,2) e imediatamente armazenados em geladeira a 4°C. Os fragmentos de folhas foram lavados três vezes em água destilada, liofilizados, montados sobre suporte de alumínio e cobertos com um filme de ouro paládio por meio de pulverização catódica. As amostras foram observadas no MEV CAMECA SX-100 Universal EPMA acoplado a um dispersor de raios-X (Cameca Instruments Inc., Trumbull, USA) operando entre 15-20 kV com corrente de 20 nA. No mínimo três imagens digitais foram obtidas de dois fragmentos de folhas de cada tratamento. Os fragmentos de folhas liofilizados foram enviados ao Prof. Richard R. Bélanger do Departamento de Fitopatologia da Université Laval (Sainte-Foy, Québec, Canadá) para serem observados no MEV acoplado a um dispersor de raios-X

3.6 Quantificação dos componentes de resistência

Para quantificar os componentes de resistência, foram marcadas a primeira, segunda, terceira e quarta do perfilho principal por planta em cada repetição dos tratamentos.

3.6.1 Período de incubação (PI)

O PI, tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas visíveis (necrose com halo clorótico), foi avaliado a cada quatro horas nas folhas marcadas.

3.6.2 Severidade da mancha marrom e área abaixo da curva de progresso

Avaliou-se a severidade da doença às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI) utilizando-se uma escala de notas (IRRI, 1996). Os dados obtidos foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha marrom (AACPM) por integração trapezoidal (Campbell & Madden, 1990). No caso das folhas bandeira, a severidade foi avaliada às 48, 72 e 96 HAI e a AACPM foi calculada como descrito anteriormente.

3.6.3 Número de lesões (NL) por cm² de área foliar

Às 48 HAI, foi contado o NL por cm² de área foliar em quatro pontos ao acaso de todas as folhas avaliadas com auxílio de um quadrado (1x1 cm). A partir desses valores, foram calculadas as médias e obtido o número médio de lesões por cm² de área foliar.

3.6.4 Tamanho médio de lesão (TML)

O TML (mm) foi determinado às 48 HAI, medindo-se o tamanho de cinco lesões, escolhidas ao acaso, nas quatro folhas marcadas de duas plantas por repetição, de cada tratamento, utilizando-se um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Worker, USA).

3.6.5 Avaliação da severidade da mancha marrom utilizando-se o programa QUANT 1.0

Ao final das avaliações da severidade da mancha marrom, as quatro folhas marcadas das duas plantas avaliadas foram coletadas e suas respectivas imagens foram obtidas em scanner com resolução de 400 dpi. As imagens foram

processadas no programa QUANT 1.0 (Vale *et al.*, 2003) para obtenção da área foliar lesionada.

3.7 Avaliação da taxa fotossintética (TF) em folhas de plantas de trigo

A taxa de assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi medida às 0, 48, 72 e 96 HAI utilizando o aparelho “LI-6400 Portable Photosynthesis System” (Li-Cor®, Lincoln, Nebraska, USA). A primeira folha abaixo da folha bandeira [estádio 45 de acordo com a escala de (Zadoks, 1974)] bem como a folha bandeira das plantas de cada repetição e tratamento foram marcadas. O terço médio dessas folhas foi inserido no interior de uma câmara ventilada com a face superior da folha sendo iluminada com luz artificial ($900 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa). As leituras foram tomadas no horário entre 8 e 11 horas da manhã. As leituras foram sempre realizadas nas folhas marcadas. Antes da realização das leituras, as plantas foram mantidas em condição ambiente por 15 min, sendo esta condição mantida até o término das leituras.

3.8 Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos

As amostras da primeira e da segunda folha do perfilho principal de plantas de trigo, de cada repetição e tratamento, foram coletadas às 0, 12, 24, 48, 72 e 96 HAI para determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais e derivados da lignina ácido-tioglicólico. Imediatamente após a coleta das folhas, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C até análise.

3.8.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST)

Amostras de 0,1 g de tecido foliar fresco foram maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para eppendorfs, onde foram homogeneizados com 1,5 mL de Metanol 80% e permaneceram durante 12 h, em mesa agitadora (150 rpm), a temperatura ambiente (25°C) para a extração. Os eppendorfs foram

cobertos com papel alumínio para proteger a oxidação do extrato metanólico pela luz. O extrato metanólico, verde escuro, foi centrifugado a 12000 g, por 5 min e, após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O resíduo foi mantido a -80°C para determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. A metodologia proposta por (Zieslin & Ben-Zaken, 1993), com algumas modificações, foi usada para determinar a CFST. Um volume de 150 µL do reagente “Folin & Ciocalteu’s Phenol” 0,25 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado a 150 µL do extrato metanólico. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por cinco min. Posteriormente, 150 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1,0 M foi adicionado à mistura, na qual sofreu nova homogeneização e permaneceu a temperatura ambiente por 10 min. Decorrido esse período, 1 mL de água destilada foi adicionado e após 30 min, a absorbância das amostras foi mensurada a 725 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP 2000UV - BEL Photonics). A concentração de CFST foi expresso em mg de compostos fenólicos (em termos de catecol) por kg de matéria fresca.

3.8.2 Determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG)

Um volume de 1,5 mL água estéril destilada foi adicionado ao resíduo obtido, após a extração dos CFST como descrito anteriormente. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12000 g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo secado a 65°C por 12 h. O resíduo alcólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos, associados à parede celular, foi usado para determinação da lignina de acordo com os métodos de (Barber & Ride, 1988). Um volume de 1,5 mL da solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e HCl 2 N 1:10 foi adicionado ao resíduo seco. Os microtubos foram levemente agitados para hidratar o resíduo e, em seguida, colocados em banho-maria (100°C) por quatro horas. Após esse período, os tubos foram colocados em bandejas com gelo onde permaneceram por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada esterilizada com centrifugação a 10000 g por 10 min. Após essa etapa, o sobrenadante foi

descartado e o precipitado resuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 N. A mistura permaneceu em mesa agitadora (150 rpm) à temperatura ambiente (25°C) por 12 hs. Após esse período, a mistura foi centrifugada novamente a 10000 g por 10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Após a adição de 200 µL de HCL concentrado ao sobrenadante, os tubos foram transferidos para uma bandeja com gelo e mantidos na geladeira (4°C) por quatro horas para precipitação dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. Após a centrifugação a 10000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, de cor laranja-amarronzado, dissolvido em 2 mL de NaOH 0,5 N. A leitura da absorbância foi feita a 290 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP 2000UV - BEL Photonics). A concentração dos derivados LATG foi expressa em mg/kg⁻¹ de matéria fresca e utilizou-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

3.9 Determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa de plantas a patógenos.

As amostras da primeira e da segunda folha do perfilho principal de três plantas de trigo, de cada repetição e tratamento, foram coletadas às 0, 12, 24, 48, 72 e 96 HAI para a determinação da atividade enzimática de peroxidases, polifenoloxidasas e quitinases. Imediatamente após a coleta das folhas, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C onde permaneceram até análise.

3.9.1 Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

O extrato enzimático bruto foi obtido conforme metodologia descrita por (Peixoto, 1998). Foi macerado 0,5 g da amostra de folha com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de um pistilo, ambos de porcelana, seguido de homogeneização com 1% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), em 10 mL solução de extração constituída de ácido fenil-metil-sulfonil-fluorídrico (PMSF) 1 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM e tampão fosfato de potássio 100 mM, em pH 6,8. O homogeneizado foi filtrado em gaze e, então centrifugado por 15 min a 12000 g. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas do processo foram executadas em gelo. A atividade

da POX no tecido foliar foi determinada pelo método de (Kar & Mishra, 1976). Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionados a uma mistura de reação composta de 950 µL de água destilada, 750 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8, 600 µL de pirogalol 100 mM e 600 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM, a temperatura de 25°C. O início da reação ocorreu com a adição do sobrenadante a mistura de reação. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro digital (Specctrophotometer SP 2000UV - BEL Photonics) a 420 nm, a cada 60 s, durante 5 min, totalizando cinco leituras. A atividade da POX foi determinada pela medição da quantidade de purpurogalina formada entre dois e cinco minutos de reação utilizando-se, para o cálculo, o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955). Durante todas as etapas, os tubos de ensaio foram envolvidos com papel alumínio e tampados.

3.9.2 Polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1)

O extrato enzimático bruto foi obtido conforme metodologia descrita por (Peixoto, 1998). Foi macerado 0,5 g da amostra de folha, em nitrogênio líquido dentro de almofariz com pistilo, ambos de porcelana, seguido de homogeneização com 1% (p/v) de PVPP, em 5 mL solução de extração constituída de PMSF 1 mM, EDTA 0,1 mM e tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 6,8. O homogeneizado foi filtrado em gaze e depois centrifugado por 15 min a 12000 g. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas do processo foram executadas a 4°C ou em gelo. A atividade da PFO no tecido foliar foi determinada conforme descrito para a POX, a exceção do peróxido de hidrogênio para a POX.

3.9.3 Quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)

O extrato enzimático bruto foi obtido conforme metodologia descrita por (Lanna *et al.*, 1996). Foi macerado 0,5 g da amostra de folha em nitrogênio líquido dentro de almofariz com pistilo, ambos de porcelana, seguido de homogeneização com 1% (p/v) de PVPP em 1,5 mL de solução de extração constituída de PMSF 1 mM e tampão fosfato de sódio 50 mM, em pH 6,5. O homogeneizado foi filtrado em gaze e então centrifugado por 25 min a 20000 g. O sobrenadante foi utilizado

no teste enzimático. Todas as etapas do processo foram executadas a 4°C ou em gelo. A atividade da QUI no tecido foliar foi determinada pelo método de (Roberts & Selitrennikoff, 1988) modificado por (Harman *et al.*, 1993). Alíquotas de 20 µL do sobrenadante foram adicionados a uma mistura de reação composta de 470 µL tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5,0 e 10 µL de substrato p-nitrofenil-β-D-N'-diacetilquitobiose (PNP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 2 mg mL⁻¹. Após incubação por 2 horas na temperatura de 37°C, a reação foi interrompida com adição de 500 µL de carbonato de sódio 0,2 M. Para cada tratamento e época de coleta do tecido foliar, foi preparado um tubo controle contendo 470 µL tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5,0 e 10 µL de substrato PNP 2 mg mL⁻¹ e 20 µL do sobrenadante. Neste tubo, o carbonato de sódio foi adicionado imediatamente após a adição do sobrenadante e também incubado por duas horas na temperatura de 37°C. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro digital (Specctrophotometer SP 2000UV - BEL Photonics) a 410 nm imediatamente após a parada da reação. A atividade da QUI foi determinada considerando a diferença de absorbância entre as reações de duas horas e a do tubo controle. Foi utilizado para o cálculo o coeficiente de extinção molar de 7 M⁻¹ cm⁻¹.

3.9.4 Determinação da concentração total de proteínas

Foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Warburg & Christian, (1941) de todas as amostras utilizadas para as determinações enzimáticas diluindo-se 20 µL do sobrenadante em 980 µL de água destilada com leituras de absorbância em 260 e 280 nm.

3.10 Delineamento experimental e análise estatística

Para avaliação dos componentes de resistência, o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, adotando-se um arranjo fatorial 2x2 com sete repetições. Os fatores estudados foram: Si (0 e 0,35 g de Si por kg de material de solo) e duas cultivares de trigo, BR-18 e BRS-208. Cada unidade experimental foi composta de um vaso plástico contendo 1 kg de material de solo

com duas plantas. O experimento foi conduzido em duas épocas diferentes, um em julho e outro em agosto. Os dados referentes a cada variável avaliada nos experimentos foram combinados, quando possível, depois de confirmada a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett (Gomez & Gomez, 1994). Utilizou-se o programa ESTAT (Banzatto & Kronka, 1997) para análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F quando não houver interação entre os fatores. Foi feita a análise correlação de Pearson entre a concentração foliar de Si e alguns componentes de resistência utilizando-se o programa STATISTICA (STATSOFT, 2001).

Os dados das variáveis TF, CFST, DLATG, atividade das enzimas POX PFO e QUI em cada época de coleta nos tratamentos plantas inoculadas ou não e supridas ou não com Si foram comparadas pelo teste-*t* de Student ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração foliar de Cálcio e Silício

Analisando os fatores referentes aos dois ensaios, verificou-se diferença significativa apenas para o fator cultivares quanto à concentração foliar de Ca. Não houve diferença significativa para a interação doses de Si x cultivares de trigo ($P \leq 0,05$). Na cultivar BR-18, a concentração de Ca foi 39% maior do que na cultivar BRS- 208 (Tabela 4).

Para a concentração foliar de Si, verificou-se diferença significativa apenas para o fator doses de Si. Houve um aumento de 90,5% na concentração de Si foliar com a adição desse elemento ao solo (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração foliar de Cálcio (Ca) e Silício (Si) em plantas das cultivares de trigo BR-18 e BRS-208 supridas (+Si) ou não (-Si) com Silício.

Fatores	Concentração (%)	
Silício	Ca	Si
-Si	0,76	0,63
+Si	0,77	1,20
Valor de F	0.2646 ^{NS}	327.2678 ^{**}
Cultivares		
BR-18	0,89	0,92
BRS- 208	0,64	0,90
Valor de F	17.7275 ^{**}	.2786 ^{NS}
C.V. (%)	16	13

Dados de dois experimentos combinados. C.V. = coeficiente de variação. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{NS} = não significativo.

4.2 Microanálise de raios-X para determinar a deposição de silício em folhas de trigo

Foram observados diferentes padrões de deposição de Si na superfície foliar de plantas de trigo das duas cultivares supridas ou não com esse elemento. Nas folhas das plantas das duas cultivares de trigo, na ausência de Si, observou-se que esse elemento depositou-se ao longo de uma linha específica a qual corresponde as células silicatadas e, raramente, nos tricomas (Figs. 1A e C).

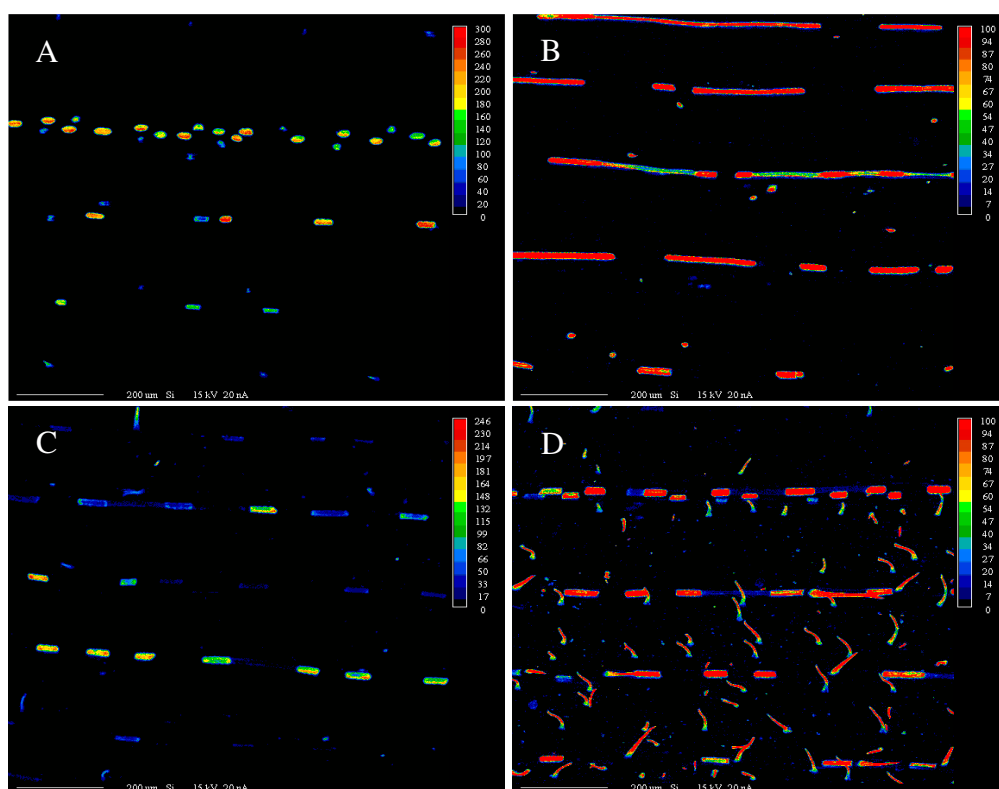


Figura 1. Detecção de silício por microanálise de raios-X em folhas de plantas de trigo infectadas com *Bipolaris sorokiniana*. Cultivares BR-18 (A e B) e BRS- 208 (C e D) crescidas na ausência (A e C) ou presença (B e D) de silício. Segmentos vermelhos correspondem à presença de silício.

Nas plantas das duas cultivares que receberam Si, observou-se uma maior deposição desse elemento ao longo de todas as linhas formadas por células silicatadas, o que é retratado pela intensidade da coloração vermelha (Figs. 1B e D). Verificou-se um padrão diferenciado na deposição de Si entre as cultivares. Na cultivar BR-18, o Si concentrou-se mais nas células silicatadas; já na cultivar BRS-208, esse elemento, além de depositar nessas células, ocorreu em abundância nos tricomas e de forma esparsa na superfície foliar como pode ser visto pelos pontos de coloração azul (Figs. 1B e D).

4.3 Sintomas da mancha marrom em plantas de trigo supridas ou não com silício.

Independente das cultivares estudadas, os sintomas da mancha marrom foram semelhantes. Observa-se que nas folhas de plantas que não receberam Si, as

lesões apresentaram em grande número e foram maiores com intensa clorose ocasionando o crestamento foliar em função do coalescimento das mesmas (Fig. 2). No entanto, em folhas de plantas supridas com Si, as lesões foram pequenas, em menor número e o halo clorótico mostrou-se reduzido (Fig. 2).

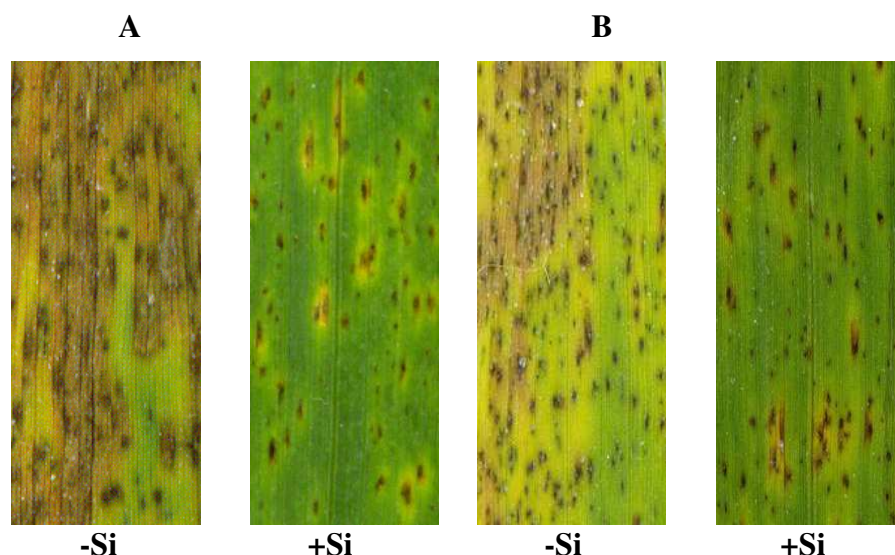


Figura 2. Sintomas da mancha marrom em folhas de plantas de trigo das cultivares BR18 (A) e da cultivar BRS 208 (B) supridas ou não com silício às 72 horas após a inoculação.

4.4 Efeito do Si nos componentes de resistência

4.4.1 Período de incubação (PI)

Houve diferença significativa para os fatores Si e cultivares de trigo ($P \leq 0,05$). A aplicação de Si aumentou o PI em 10 h (Tabela 5). O PI foi significativamente maior na cultivar BRS-208 com um acréscimo de 3 h em relação a cultivar BR-18.

4.4.2 Progresso da mancha marrom e AACPM

A severidade da mancha marrom das 24 às 96 HAI foi crescente nas plantas das duas cultivares de trigo, porém atingiu os maiores valores em plantas que não receberam Si (Fig. 3).

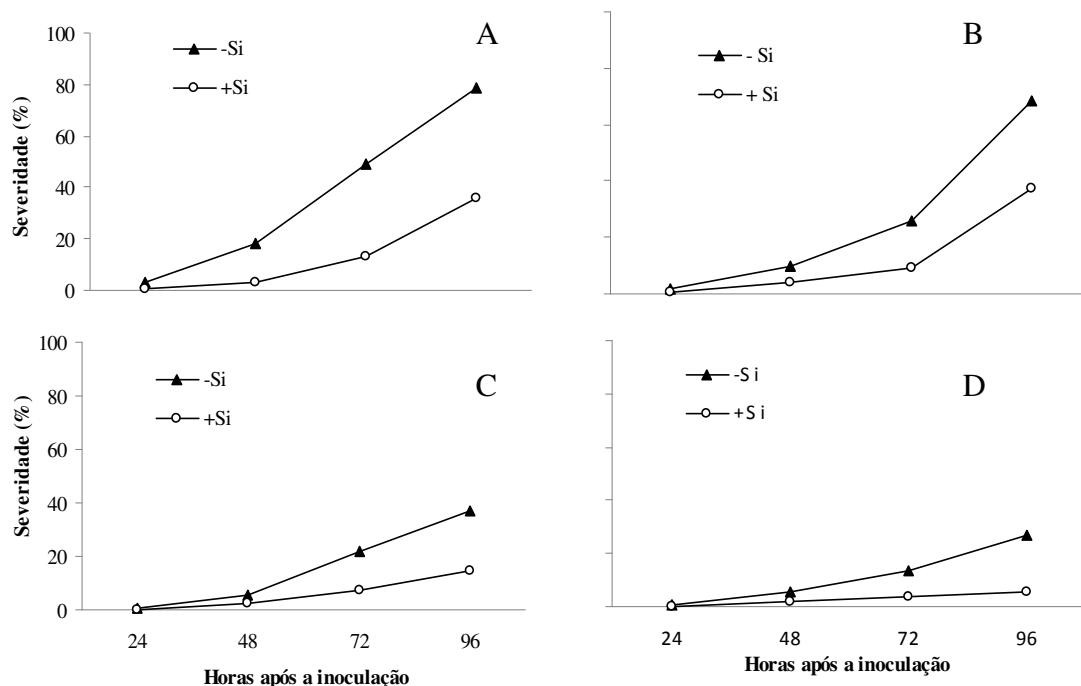


Figura 3: Progresso da mancha marrom em folhas de plantas de trigo das cultivares BR18 (A e C) e BRS 208 (B e D) crescidas na presença (+Si) ou ausência de silício (-Si) nos experimentos 1 (A e B) e 2 (C e D).

Para a variável AACPMM, houve diferença estatística, pelo teste F, apenas para o fator doses de Si ($P \leq 0,05$). A aplicação desse elemento reduziu significativamente a AACPMM em 62% (Tabela 5).

4.4.3 Tamanho médio de lesão

Em relação ao tamanho médio das lesões, avaliado às 48 HAI, não houve diferença significativa pelo teste F para o fator cultivares de trigo bem como para a interação cultivares de trigo x Si ($P \leq 0,05$). A aplicação de Si reduziu em 31% o tamanho médio de lesão em relação a não aplicação desse elemento no solo (Tabela 5).

4.4.4 Número de lesões (NL) por cm² de área foliar

Após o agrupamento dos dados de cada tratamento, referentes aos dois ensaios, constatou-se efeito significativo apenas para o fator Si. O NL foi reduzido em 58% na presença do Si. (Tabela 5).

Tabela 5. Período de incubação (PI), área abaixo da curva do progresso da mancha marrom (AACPM), tamanho médio de lesão (TML) e número de lesões (NL) por cm² de área foliar em plantas das cultivares de trigo BR-18 e BRS-208 supridas (+Si) ou não (-Si) com silício.

Fatores	Componentes de Resistência			
Silício	PI (h)	AACPM	TML (mm)	NL/cm ²
-Si	25	1470	1,57	19,35
+Si	35	557	1,20	12,37
Valor de F	47,1629**	26,1059**	33,7611**	7.0381*
Cultivares				
BR-18	28	1163	1,44	15,23
BRS-208	31	863	1,33	16,48
Valor de F	6,5328*	2,8284 ^{ns}	3,3928 ^{ns}	0,2262 ^{ns}
C.V. (%)	16	62	10	56

Dados de dois experimentos combinados. C.V.=coeficiente de variação * = significativo ao nível de 5% de probabilidade. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{ns} = não significativo.

4.4.5 Progresso da mancha marrom na folha bandeira e AACPM na folha bandeira

A severidade da mancha marrom das 48 às 96 HAI foi crescente nas duas cultivares, porém atingiu os maiores valores em plantas que não receberam a aplicação de Si (Fig. 4).

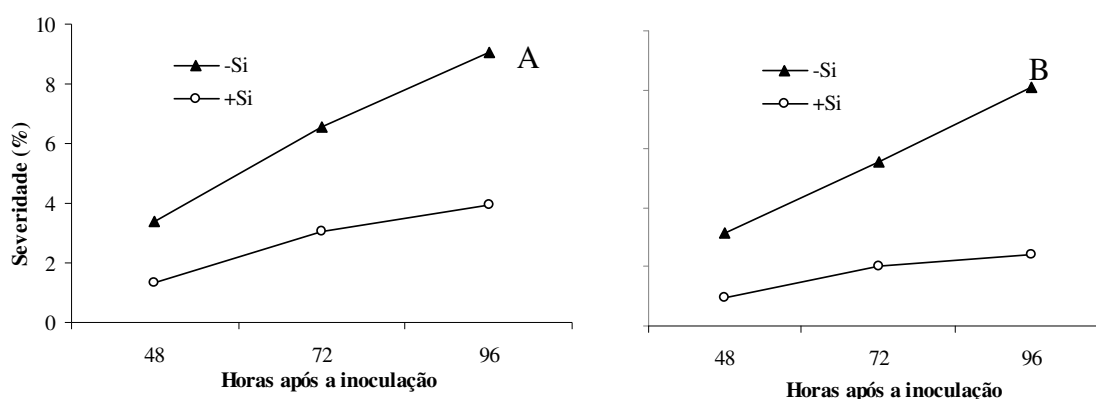


Figura 4. Progresso da mancha marrom em folhas bandeira de plantas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-208 (B) crescidas na presença (+Si) ou na ausência (-Si) de silício. Dados do segundo experimento.

Constatou-se pelo teste F, diferença significativa apenas para os fatores Si e cultivares de trigo quanto a AACPMM. Esta variável foi reduzida em 58% com a aplicação de Si (Fig. 5). A AACPMM nas folhas bandeira da cultivar BR-18 foi 37% maior do que o observado nas folhas bandeira da cultivar BRS- 208.

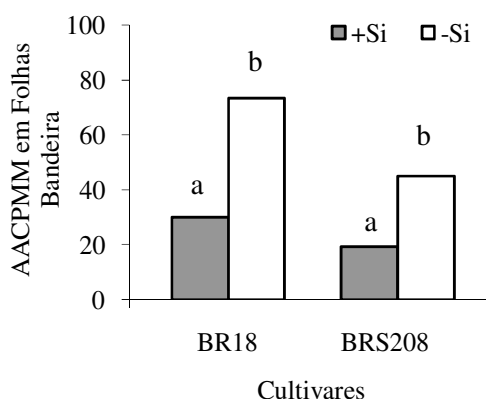


Figura 5. AACPMM em folhas bandeira de plantas de trigo das cultivares BR-18 e BRS-208 crescidas na presença (+Si) ou ausência (-Si) de silício. Dados do segundo experimento.

4.4.6 Severidade final da mancha marrom

Obtiveram-se, pelo teste F, diferenças significativas apenas para o fator Si no primeiro experimento. Com a aplicação de Si a severidade final foi reduzida em 50%. Para o segundo experimento, houve diferenças estatísticas significativas teste de F tanto para o fator cultivares de trigo e também para o fator Si ($P \leq 0,05$). Com a aplicação de Si a severidade final foi reduzida em 69%.

4.4.7 Severidade real estimada pelo QUANT

Detectaram-se, pelo teste F, diferenças significativas apenas para o fator Si no primeiro experimento. Com a aplicação desse elemento, a severidade real foi reduzida em 38,14%. Para o segundo experimento, houve diferença estatística significativa para os fatores cultivares de trigo e Si ($P \leq 0,05$). A aplicação de silício reduziu significativamente a severidade real em 52,14% (Tabela 6).

Tabela 6. Severidade final (SF) e severidade real (SR) da mancha marrom estimada pelo QUANT em plantas das cultivares de trigo BR-18 e BRS-208 supridas (+Si) ou não (-Si) com silício.

Fatores	SF		SR	
Silício	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
-Si	73,40	31,89	69,15	42,59
+Si	36,38	9,71	42,77	20,38
Valor de F	41,942 **	26,306 **	15,509 **	17,827 **
Cultivares				
BR-18	56,98	25,57	57,29	38,50
BRS-208	52,81	16,03	54,64	24,47
Valor F	0,531 ^{ns}	4,860 *	0,156 ^{ns}	7,1139 *
C.V. (%)	25	47	28	39

Dados de dois experimentos combinados. C.V.=coeficiente de variação * = significativo ao nível de 5% de probabilidade. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{ns} = não significativo.

4.5 Análise de correlação de Pearson

Houve correlação positiva e significativa entre a concentração foliar de Si com o PI (Tabela 7). A concentração de Si correlacionou-se significativa e negativamente com a AACPM e o TML. Não houve correlação significativa entre a concentração foliar de Si e o NL bem como com a concentração foliar de cálcio (Tabela 7).

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração foliar de Silício e os componentes de resistência período de incubação (PI), área abaixo da curva de progresso da mancha marrom (AACPM), tamanho médio de lesão (TML), número de lesões (NL) e a concentração foliar de Cálcio.

Componentes de resistência x concentração de Si	Coeficiente de correlação (r)
PI (h)	0,62*
AACPM	-0,57*
TML (mm)	-0,70*
NL	-0,18 ^{ns}

* = significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{ns} = não significativo.

4.6 Taxa fotossintética em folhas de plantas de trigo

A inoculação com *B. sorokiniana* causou uma redução significativa ($P \leq 0,05$) na TF de folhas de trigo nas cultivares supridas ou não com Si (Figs. 6A e 6B). No decorrer da infecção, as taxas fotossintéticas em plantas supridas com Si foram consideravelmente maiores do que aquelas observadas em plantas não supridas com esse elemento.

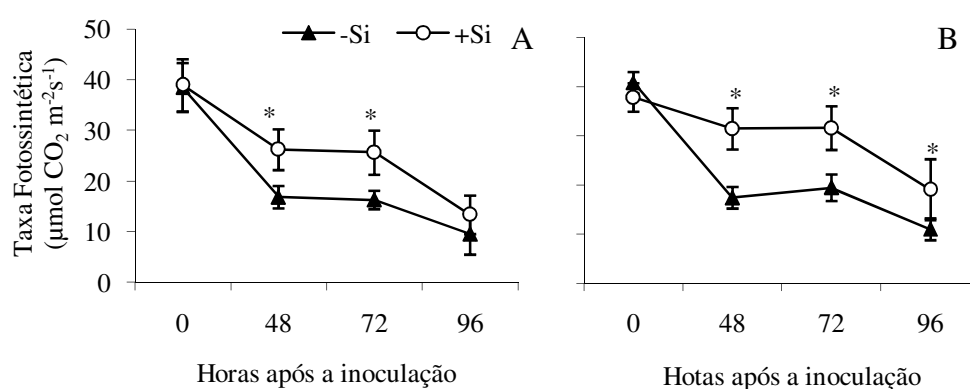


Figura 6. Taxa fotossintética em folhas de plantas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* e supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste-*t* ao nível de 5% de probabilidade em cada época de avaliação. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

Não houve diferença significativa entre as taxas fotossintéticas de plantas não inoculadas, supridas ou não com Si, independente da cultivar. Apenas para a cultivar BR-18 não houve diferença significativa entre as TF às 96 HAI. (Fig. 6A). O mesmo padrão pode ser observado nas folhas bandeira (Figs. 7A e 7B). Entretanto, a TF nessas folhas supridas com Si foi menor do que o observado em plantas não supridas com esse elemento antes da inoculação.

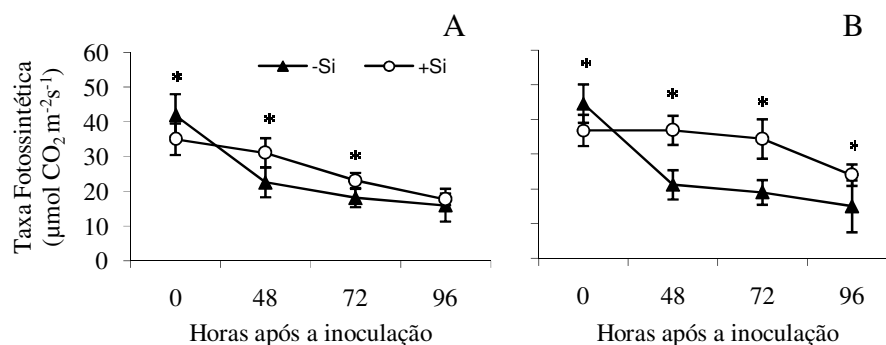


Figura 7. Taxa fotossintética em folhas bandeira de plantas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* e supridas ou não com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste-*t* ao nível de 5% de probabilidade em cada época de avaliação. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

4.7 Concentração de CFST

O pico de concentração de CFST em plantas da cultivar BR-18 não supridas com Si ocorre às 24 HAI, seguida de pequeno decréscimo e estabilização (Fig. 8). No entanto, em plantas supridas com Si dessa mesma cultivar verificou-se pequeno decréscimo na concentração de CFST entre 0 e 12 HAI, seguido de aumento até as 96 HAI. A CFST em plantas não supridas com Si foram sempre superiores àqueles apresentados por plantas supridas com esse elemento (Fig. 8). No caso da cultivar BRS-208, a CFST manteve-se constante tanto em plantas crescidas na ausência quanto na presença de Si até as 48 HAI. No entanto, a partir desse ponto houve um decréscimo nos níveis CFST em plantas supridas com Si seguido de aumento às 96 HAI. Verificou-se também um aumento na concentração de CFST, em plantas não supridas com Si até às 72 HAI.

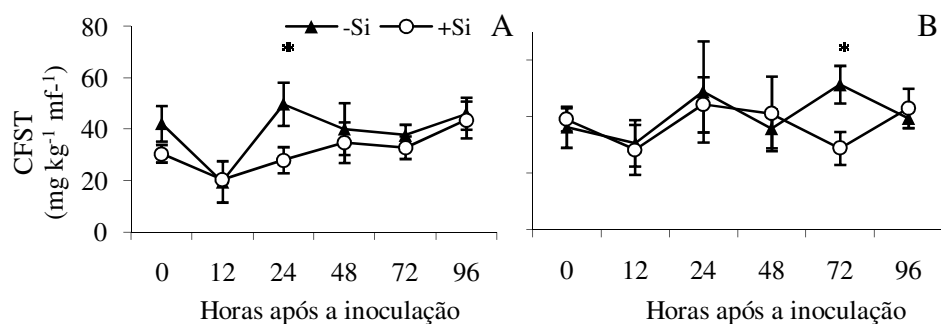


Figura 8. CFST em folhas de trigo das cultivares BR18 (A) e BRS208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* e supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste-*t* ao nível de 5% de probabilidade para cada época de coleta. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

4.8 Derivados da LATG

Observou-se uma oscilação na concentração dos derivados da LATG em plantas da cultivar BR-18 não supridas com Si durante todo o período avaliado (Fig. 9).

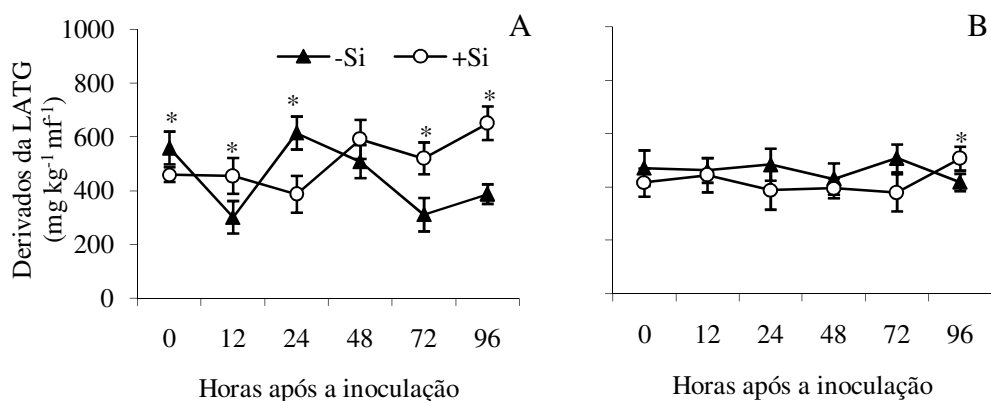


Figura 9. Concentração de derivados lignina ácido tio-glicólico (LATG) em folhas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* e supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade para cada época de coleta. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

No entanto, em plantas supridas com Si dessa mesma cultivar até as 24 h, concentrações de derivados da LATG mantiveram-se constantes, seguido de aumento entre 24 e 96 HAI. A partir das 24 HAI, as concentrações de derivados de LATG em plantas não supridas com Si foram sempre inferiores àqueles observados em plantas supridas com esse elemento (Fig. 9).

Para a cultivar BRS-208, as concentrações de derivados da LATG mantiveram-se constantes tanto na ausência quanto na presença de Si até às 72 HAI, com maior concentração em plantas não supridas com Si (Fig. 9A). No entanto, a partir desse ponto houve um decréscimo na concentração de derivados da LTGA em plantas não supridas com Si e um aumento em plantas supridas com esse elemento até as 96 HAI (Fig. 9B).

4.9 Atividade de enzimas relacionadas com a defesa de plantas à patógenos

4.9.1 Quitinases

Observou-se que a atividade de quitinases em folhas de plantas de trigo da cultivar BR-18 supridas com Si permaneceu constante ao longo das avaliações (Fig. 10A).

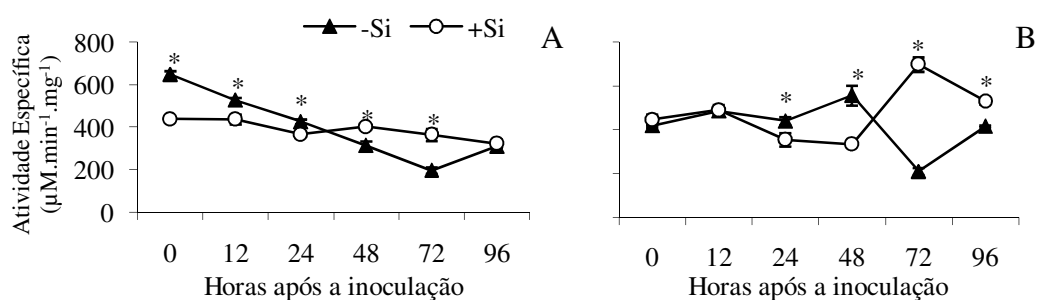


Figura 10. Atividade de quitinases em folhas de plantas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste- *t* ao nível de 5% de probabilidade para cada época de coleta. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

Em plantas que não receberam aplicação de Si, observou-se um decréscimo até às 72 h, seguido de um pequeno aumento. Além disso, a partir das 24 HAI a atividade de quitinases foi sempre maior em plantas supridas com Si. Para a cultivar BRS-208, a atividade de quitinases manteve-se constante até as 12 h em plantas supridas ou não com Si (Fig. 10B).

Em plantas supridas com Si a partir das 12 HAI ocorreu um pequeno decréscimo na atividade de quitinases até as 48 HAI seguido de um aumento abrupto às 72 HAI e decréscimo às 96 HAI (Fig. 10B). A atividade de quitinases em folhas de plantas não supridas com Si permaneceu constante até às 48 HAI,

seguida de um acentuado decréscimo de atividade às 72 HAI e de um aumento às 96 HAI.

4.9.2 Peroxidases

A atividade das peroxidases manteve-se constante até as 48 HAI, em folhas de plantas da cultivar BR-18, supridas ou não com Si (Fig. 11). Observaram-se, diferenças significativas na atividade de peroxidases entre plantas supridas com Si e não supridas com Si. Interessantemente a atividade máxima de peroxidases foi observada em plantas não supridas com Si às 72 HAI. A atividade máxima em plantas supridas com Si ocorreu às 96 HAI e correspondeu a aproximadamente 50% da atividade máxima observada em plantas não supridas com Si. No caso da cultivar BRS-208, observou-se que a atividade de peroxidases foi significativamente maior em plantas supridas com Si ao longo de todas as avaliações, com atividade máxima às 96 HAI. A atividade das peroxidases manteve-se constante ao longo de todas as avaliações em plantas da cultivar BRS-208 não supridas com Si.

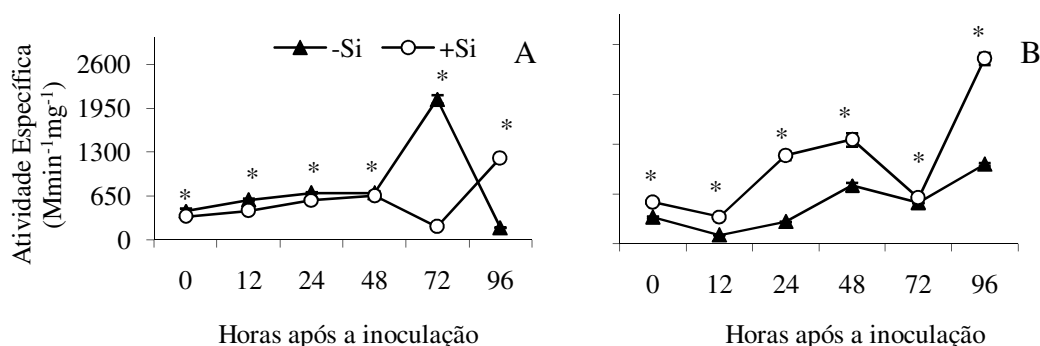


Figura 11. Atividade de peroxidases em folhas de plantas de trigo das cultivares BR18 (A) BRS 208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* e supridas ou não com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste- *t* ao nível de 5% de probabilidade para cada época de coleta. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

4.9.3 Polifenoloxidasas

A atividade de polifenoloxidasas em plantas da cultivar BR-18 supridas com esse elemento foi significativamente menor ao observado em plantas não supridas com Si entre 0 e 12 HAI (Fig. 12A). No entanto, a partir das 48 HAI a

atividade de polifenoloxidasas permaneceu constante e sem diferenças significativas entre plantas supridas ou não com Si até as 72 HAI. Às 96^BHAI, verificou-se uma maior atividade enzimática em plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 12A). A atividade de polifenoloxidasas apresentou-se estável em plantas da cultivar BRS-208 supridas ou não com Si, com diferenças significativas para algumas épocas de coletas (Fig. 12B).

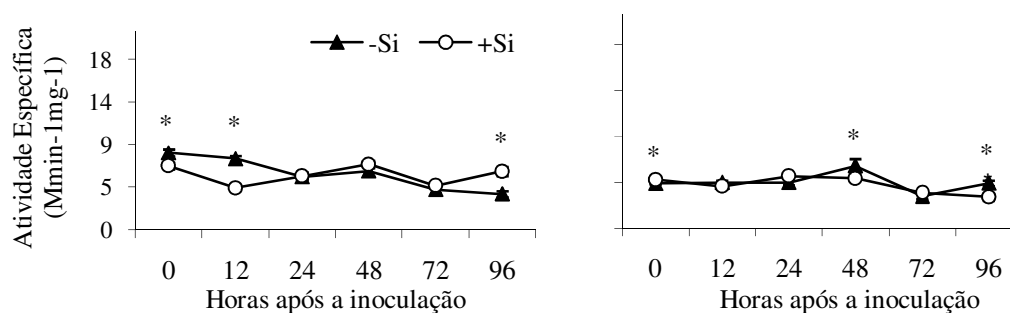


Figura 12. Atividade de polifenoloxidasas em folhas de plantas das cultivares de trigo BR 18 (A) BRS 208 (B) inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste- *t* ao nível de 5% de probabilidade para cada época de coleta. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média.

5 DISCUSSÃO

Dos resultados deste estudo resultam as primeiras evidências de que alguns componentes de resistência do trigo a mancha marrom podem ser afetados pela aplicação de Si, a semelhança do observado para outros patossistemas (Datnoff *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 2001a, 2003; Rodgers-Gray & Shaw, 2000, 2004; Seebold *et al.*, 2001; Resende, 2007). As alterações nos componentes de resistência podem de fato ser atribuídas ao Si, uma vez que as concentrações foliares de Ca não diferiram entre as plantas supridas ou não com esse elemento. Além disso, a concentração de Si nas folhas correlacionou positivamente aos componentes de resistência em estudo, a exceção do NL por cm², demonstrando a importância do Si em reduzir a intensidade da mancha marrom.

Epstein (1994) realizou um estudo detalhado sobre a capacidade de absorção de Si por diversas espécies de plantas de interesse comercial, demonstrando que muitas espécies economicamente importantes são capazes de absorver Si. Em geral, gramíneas são eficientes em absorver Si se comparadas com as dicotiledôneas (Epstein & Bloom, 2005). As maiores quantidades de Si são encontradas em arroz, onde o Si responde por aproximadamente 6,3% do peso da matéria seca das folhas (Epstein, 1999). No presente trabalho, a concentração foliar média de Si foi de 1,20%, corroborando com os resultados obtidos por Rodrigues *et al.*, (2001b) que encontrou valores em torno de 1% de Si em folhas de trigo quando crescidas na dose máxima desse elemento. Há de ressaltar que, as concentrações foliares de Si no presente estudo não foram tão elevadas quando comparadas com aquelas encontradas em arroz. Entretanto, nessas concentrações, verificou-se alterações nos principais componentes de resistência do trigo à mancha marrom, indicando que o Si pode ser adotado no manejo da doença. Resultados semelhantes foram encontrados no patossistema sorgo-*Colletotrichum graminicola*, onde pequenas concentrações de Si foram suficientes para reduzir a intensidade da doença (Resende, 2007).

A redução de importantes doenças pelo Si é bem documentado, porém os mecanismos de seu efeito não estão totalmente elucidados. Já se propôs que o ácido monossilícico [Si(OH)₄] pode exercer uma barreira mecânica após acumular e polimerizar na parede celular, o que afeta a penetração de certos patógenos (Kim *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 1962, 1965). Tendo em vista que o progresso de uma

doença pode ser explicado pelo aparecimento de novas lesões e pela expansão daquelas já existentes (Parlevliet, 1979), a deposição de Si na parede celular pode reduzir a intensidade da doença ao afetar os componentes de resistência como o PI e o TML.

O PI é um importante componente de resistência em muitos patossistemas (Johnson & Wilcoxson, 1978; Parlevliet, 1979; Pelletier & Fry, 1989; Rotem, 1994), e já se demonstrou que a aplicação de Si pode atuar sobre ele. Em arroz, o PI de *Magnaphorte grisea* e de *Rhizoctonia solani* foram consideravelmente prolongados pela aplicação de Si no solo (Seebold *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003). No patossistema trigo-*B. sorokiniana* a aplicação de Si prolongou o PI em ambas as cultivares em até 10 h. Esse aumento pode ser decorrente do impedimento físico propiciado pelo Si, considerando-se o modo de ação proposto por (Yoshida *et al.*, 1962), tendo em vista os diferentes padrões de deposição de Si observado na superfície foliar de plantas de trigo supridas ou não com esse elemento. Em plantas que receberam Si, observou-se grande abundância deste elemento ao longo da linha formada pelas células silicatadas e nos tricomas, ao passo que em plantas não supridas com esse elemento, observa-se menor intensidade de Si ao longo desta linha e também em tricomas. Este padrão diferenciado de deposição de Si pode estar relacionado ao aumento no PI em plantas supridas com Si, haja vista que o Si depositado em grandes quantidades ao longo da folha representa um obstáculo adicional que o fungo deve transpor para penetrar a cutícula e a parede celular. Esse perfil de acúmulo de Si em folhas de trigo parece ser um padrão para a espécie, pois os resultados foram similares aqueles obtidos por Guével *et al.* (2007). Esses mesmos autores relataram que o controle do oídio foi tanto melhor quanto maior foi a deposição de Si nas folhas de plantas de trigo, demonstrando que algum tipo de impedimento físico deve ocorrer para a restrição do patógeno.

Além do PI, o NL e o TML são usados para determinar a resistência genética de plantas, bem como, para avaliar a agressividade de patógenos (Johnson & Taylor, 1976; Luo & Zeng, 1995; Berger *et al.*, 1997). Com o aumento da concentração de Si nas folhas esses componentes de resistência são freqüentemente modificados (Seebold *et al.*, 2001) resultando em menor infecção. Neste contexto, é interessante notar que a aplicação de Si afetou negativamente o TML e o NL por cm² independentemente do nível de resistência das cultivares. As

alterações observadas no que diz respeito ao NL por cm² e TML podem ser resultantes da reação da planta sobre vários estágios do desenvolvimento de *B. sorokiniana*, ou seja, desde a adesão dos conídios até a colonização do tecido foliar, em conformidade com o exposto por Parlevliet (1979).

Com a AACPD obtém-se informações quantitativas de modo integrado sobre o efeito dos diversos componentes de resistência na redução da severidade da doença (Campbell & Madden, 1990). Coerentemente com os resultados obtidos para os demais componentes de resistência a AACPM foi reduzida pela aplicação de Si. A aplicação de Si reduziu a severidade final da mancha marrom, independentemente da cultivar. Considerando a subjetividade da avaliação visual da severidade de doenças, em função da dificuldade de discernimento entre área necrótica e clorótica em estágios avançados da doença, sistemas de análise de imagens têm sido utilizados para auxiliar sua mensuração (Liberato, 2003). Segundo esta análise com a aplicação de Si, a severidade real (área necrótica e clorótica) foi reduzida em média 45%. Esse resultado confirma a avaliação visual, e demonstra que o Si reduz a severidade da mancha marrom do trigo, a exemplo de outras importantes doenças (Datnoff *et al.*, 2007).

Além da barreira física propiciada pelo Si os resultados deste estudo constituem as primeiras evidências de que a redução na severidade da mancha marrom do trigo pela aplicação de Si ocorre também pelas alterações de natureza fisiológica e bioquímica á semelhança do que foi observado para outros patossistemas (Rodrigues *et al.*, 2003 e 2005; Bélanger *et al.*, 2003; Rémus-Borel *et al.*, 2005).

As taxas fotossintéticas de plantas de trigo inoculadas com *B. sorokiniana*, em plantas supridas com Si foram significativamente maiores do que aquelas observadas em plantas não supridas com esse elemento. Resultados semelhantes foram obtidos por (Li *et al.*, 2007) quando plantas de milho foram submetidas a estresse hídrico. Esses autores observaram aumentos de 10 a 28 % na taxa fotossintética líquida de plantas supridas com Si em função do aumento na biomassa, e destacaram que esse aumento correlacionou-se com a maior tolerância à seca apresentada pelas plantas. No presente estudo, maiores taxas fotossintéticas podem estar relacionadas ao efeito Si em reduzir a severidade da mancha marrom. É sabido que com a maior produção de fotoassimilados as plantas são capazes de

responder ativamente ao processo de infecção, redirecionando seu metabolismo para síntese de compostos com ação anti-microbiana (Shenck *et al.*, 2000)

A resistência de plantas a doenças é um fenômeno complexo, caracterizado por uma multiplicidade de ações que em conjunto detêm o desenvolvimento do patógeno (Hammond-Kozak & Parker, 2003). Esta multiplicidade é caracterizada pela existência de diversos níveis de defesa, que muitas vezes podem sobrepor-se. Enzimas envolvidas na respiração, na fotossíntese e no metabolismo de fenilpropanóides exibem aumento em atividade nos tecidos infectados e têm sido associados com a ativação de mecanismos de reparo dos tecidos infectados e/ou injuriados. O primeiro passo do mecanismo de defesa em plantas envolve uma acumulação rápida de fenóis no local da infecção que restringe ou reduz a colonização pelo patógeno. Existe um significativo número de trabalhos na literatura descrevendo que a aplicação de Si pode afetar a concentração de compostos fenólicos durante o ataque por patógenos (Carver *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2005; Menzies *et al.*, 1991). No entanto, este não parece ser o caso do patossistema trigo-*B. sorokiniana*. Apesar de verificarmos a ocorrência de um aumento constante na concentração de compostos fenólicos solúveis totais, os valores foram menores em plantas supridas com Si.

O aumento na resistência de plantas de trigo ao oídio pela aplicação de Si foi demonstrado por Bélanger *et al.* (2003). Esses autores demonstraram a deposição de papilas na parede celular, logo abaixo ao sítio de penetração de *B. graminis* f.sp. *tritici*, em folhas de plantas que receberam Si. A papila raramente foi penetrada pelo fungo, porém nos casos em que o fungo penetrou com sucesso, um material osmiofilico que reagiu positivamente com β -1-3 glucanos (constituente da calose), recobriu a célula mãe do haustório e restringindo o seu desenvolvimento. Esse material osmiofilico formado por compostos fenólicos tiveram papel importante na resistência das plantas de trigo ao míldio pulverulento.

No patossistema trigo-*B. sorokiniana* a concentração de CFST foi sempre inferior em plantas de trigo supridas com Si, isso pode indicar que esse elemento esteja potencializando a produção de lignina uma vez que CFST são percusores da mesma. Esta observação esta de acordo com outros resultados encontrados na literatura. Segundo Kumar *et al.* (2002) a atividade da FAL (fenilalanina amônia-liase) é alta em folhas de trigo após a inoculação com diferentes isolados de *B.*

sorokiniana. Ainda segundo esse autor, os isolados mais agressivos induzem uma expressão precoce do gene da FAL, o que pode sugerir que a ativação da rota dos fenilpropanóides não esteja associada à defesa à *B. sorokiniana*. A FAL promove a primeira etapa enzimática de conversão da fenilalanina à ácido cinâmico, que leva a produção de lignina. Desse modo, o Si pode estar associado à lignificação da parede celular e não a potencialização de compostos de natureza fenólica com ação antimicrobiana.

A lignina é o produto principal do metabolismo dos fenilpropanóides e a sua deposição na parede celular das plantas é um mecanismo de defesa (Lamb *et al.*, 1989; Liang *et al.*, 1989). No presente trabalho, a concentração de derivados da LATG foi crescente em plantas da cultivar BR-18 supridas com Si. Em plantas não supridas com Si da mesma cultivar observou-se grande variação na concentração de derivados de LATG. No caso da cultivar BRS-208 a concentração de derivados da LATG manteve-se praticamente constante em plantas supridas ou não com esse elemento. Estes dados diferem daqueles relatados por Rodrigues *et al.* (2005) no patossistema arroz-*Pyricularia grisea* em que o acúmulo de lignina foi menor em plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com Si de uma cultivar de arroz suscetível a brusone. No entanto estão de acordo com os resultados apresentados por Resende (2007). No caso da cultivar BRS-208, não se observou diferenças na concentração de derivados da LATG entre plantas supridas com Si e não supridas com Si, à semelhança do que foi constatado no patossistema sorgo-*Colletotrichum graminicola*.

As quitinases ocorrem normalmente nas plantas e são induzidas como resultado de infecções por patógenos bem como por agentes abióticos (Lee & Hwang, 1996; Neuhaus, 1999). Vários trabalhos indicam que as formas extracelulares das quitinases possuem uma função imediata na defesa das plantas, com ação direta sobre as hifas fúngicas. Esta ação provoca a liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes fúngicas que podem ativar novas respostas de defesa por parte da planta (Leah *et al.*, 1991; Hammond-Kozack & Jones, 2000; Mohammadi *et al.*, 2002). No presente trabalho observou-se um aumento na atividade de quitinases a partir das 48 HAI em plantas supridas com Si das duas cultivares, porém de forma mais acentuada na cultivar BRS-208. Neste caso, parece que as quitinases são responsáveis pela contenção de *B. sorokiniana*,

impedindo que a doença progrida. Chérif *et al.* (1994) relatou um aumento na atividade de quitinases em amostras foliares de plantas de pepino supridas com Si e inoculadas com *Pythium ultimum* em comparação com amostras foliares infectadas, porém não supridas com Si.

Aumentos na atividade de peroxidases são relatados durante a infecção de plantas por patógenos (Seevers *et al.*, 1971). Esses autores sugerem que as diferentes formas de peroxidases que tem suas atividades aumentadas durante a infecção atuam inibindo o crescimento dos patógenos possivelmente através da participação na biossíntese de compostos fenólicos. Nesse estudo, a atividade de peroxidases foi maior em plantas da cultivar BR-18 não supridas com Si. No caso da cultivar BRS-208 observou-se que a atividade de peroxidases foi maior em plantas supridas com Si ao longo de todo o tempo avaliado. Segundo Kumar *et al.* (2002) o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), comumente relacionado a defesa de plantas a patógenos, apresenta um papel ambivalente no patossistema trigo-*B. sorokiniana*. O fungo *B. sorokiniana* apresentam duas fases distintas de desenvolvimento. A primeira restringe-se à colonização de apenas uma célula e a segunda fase inicia-se a partir da colonização das demais células. O papel ambivalente do H_2O_2 ocorre em função dessa característica. Durante a primeira fase o acúmulo de H_2O_2 ao redor do sítio de infecção restringe o crescimento e desenvolvimento de *B. sorokiniana* à semelhança de uma resposta de hipersensibilidade como na contenção de patógenos biotróficos. No entanto, durante a segunda fase o acúmulo de H_2O_2 é benéfico para o desenvolvimento de *B. sorokiniana*, tendo em vista que esse composto é também tóxico a célula vegetal, podendo contribuir para a morte celular. Neste caso, o papel das peroxidases parece ser essencial para a eliminação rápida dos radicais peróxidos. Neste contexto o Si exerce efeito benéfico, por manter a atividade das peroxidases em níveis elevados como observado para a cultivar BRS- 208 em plantas supridas com Si. Além disso, as peroxidases podem oxidar fenóis para formar quinonas, compostos mais tóxicos que os primeiros e que também exercem um papel importante dentro do sistema de defesa das plantas (Gogoi *et al.*, 2001). Essa pode ser também uma das razões para as baixas concentrações de CFST uma vez que fenóis podem ter sido convertidos em quinonas pelas peroxidases, cujos níveis de atividade foram elevados.

Polifenoloxidasas são enzimas que freqüentemente aumentam suas atividades em resposta ao estresse, com finalidade de promover e proteger a célula (Siegel, 1993; Soares *et al.*, 2004). Essa enzima parece não estar relacionada com a defesa das plantas de trigo a mancha marrom devido às baixas atividades observadas. Resultados semelhantes foram obtidos por (Pereira *et al.*, 2007) quando estudou a atividade dessa enzima como resposta de defesa de plantas de café e soja à ferrugem.

A redução da intensidade da mancha marrom do trigo, caracterizada pela alteração de diversos componentes de resistência decorrente da aplicação Si, e alterações na taxa fotossintética, na concentração de derivados LATG atividade de quitinases e peroxidases, indicam que esse elemento potencializa os mecanismos de resistência e abre perspectivas de sua utilização em um sistema de manejo integrado da mancha marrom.

CONCLUSÕES

- O período de incubação foi prolongado, o tamanho médio da lesão e o número médio de lesões por cm² foram negativamente afetados; a área abaixo da curva de progresso da mancha marrom a área abaixo da curva de progresso da mancha marrom em folhas bandeiras e a severidade final foram reduzidas;
- A taxa fotossintética foi maior em plantas supridas com silício e inoculadas com *B. sorokiniana*;
- A concentração de CFST encontradas em plantas de trigo supridas com Si não explicou a resistência de plantas de trigo à mancha marrom;
- A concentração dos derivados de LATG foi maior em plantas supridas com silício apenas na cultivar BR-18;
- Em plantas de trigo das cultivares supridas com Si a atividade de quitinases foi potencializada pela aplicação de Si e se relacionou com a maior resistência ao patógeno, porém a atividade da POD foi potencializada apenas em plantas supridas com Si da cultivar BRS-208.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITRIGO. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/> 2008. Acesso em fevereiro de 2008.
- BADARUDDIN, M., SAUNDERS, D.A. & SIDDIQUE, A.B. Determining yield constraints for wheat production in Bangladesh. In: Saunders DA, Hettel GP (eds), Wheat in Heat-Stressed Environments: Irrigated, Dry Areas and Rice-Wheat Farming Systems. CIMMYT. 1994. pp. 265-271.
- BANZATTO, D.A. & KRONKA, S.N. Experimentação Agrícola, FUNEP, Jaboticabal. 1997.
- BARBER, M.S. & RIDE, J.P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 185-197. 1998.
- BÉLANGER, R.R., BENHAMOU, N. & MENZIES, J.G. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). *Phytopathology* 93:402-12. 2003.
- BÉLANGER, R.R., BOWEN, P.A., EHRET, D.L. & MENZIES, J.G. Soluble silicon: Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* 70:329-335. 1995.
- BERGER, R.D., BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Lesion expansion as an epidemic component. *Phytopathology* 87:1005-1013. 1997.
- BESTWICK, C.S., BROWN, I. R. & MANSFIELD, J.W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology* 118:1067-1078. 1998.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York. John Wiley & Sons. 1990.
- CARVER, T.L. W., THOMAS, B.J., ROBBINS, M.P. & ZEYEN, R.J. Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52:223-243. 1998.
- CASEY, W.H., KINRADE, S.D., KNIGHT, C.T.G., RAINS, D.W. & EPSTEIN, E. Aqueous silicate complexes in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environment* 27:51-54. 2003.
- CAVALCANTI, L.S., BRUNELLI, K.R. & STANGARLIN, J.R. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. In: Cavalcanti, L.S., Di Pierro,

- R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. 2005. pp 81-124.
- CHANCE, B. & MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764-775. 1955.
- CHÉRIF, M., ASSELIN, A. & BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* 84:236-242. 1994.
- DANGL, J.L. & JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33. 2001.
- DATNOFF, L.E., RODRIGUES, F.Á. & SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: Datnoff, L.E. Elmer, W.H. & Huber, D.M. Mineral Nutrition and Plant Disease. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 2007. pp 233-246.
- DATNOFF, L.E. & RODRIGUES, F.Á. The role of silicon in suppressing rice diseases. The American Phytopathological Society. 28p. 2005.
- DATNOFF, L.E., DEREN, C.W. & SNYDER, G.H. Silicon fertilization for diseases management of rice in Florida. *Crop Protection* 16:525-531. 1997.
- DATNOFF, L.E., SNYDER, G.H., RAID, R.N., JONES, D.B. Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. *Plant Disease* 75:729-732. 1991.
- DEHNE, H.W. & OERKE, E.C. Investigations on the occurrence of *Cochliobolus sativus* on barley and wheat. Vol. 2. Infection, colonization, and damage to stem and leaves. *Journal. Plant Disease Protection* 92:606-617. 1985.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. Basic Plant Pathology Methods. New York: CRC Press. 1995.
- DUVEILLER, E., GARCIA, I., FRANCO, J., TOLEDO, J., CROSSA, J., LOPEZ, E.F. Evaluating spot blotch resistance of wheat: Improving disease assessment under controlled condition and in the field. In: Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J., McNab, E.A. (eds), *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot blotch and Tan Spot*, CIMMYT. 1998. pp. 171-181.
- ELAWAD, S.H., GREEN, V.E. Silicon and the rice plant environment: a review of recent research. *II Riso* 28:235-253. 1979.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro: 1999.
- EPSTEIN, E., BLOOM, A. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. 2nd ed. Sinauer Associates. 2005.

- EPSTEIN, E. Silicon. Annual. Review. Plant Physiology 50:641-664. 1999.
- EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. Proceedings of the National Academic Science of the United States of America 91:11-17. 1994.
- FAUTEUX, F., CHAIN, F. & BELZILE, F. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America 103: 17554-17559. 2006.
- FAWE, A., ABOU-ZAID, M., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R.R. Silicon mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. Phytopathology 88:396-401. 1998.
- GOGOI, R., SINGH, D.V. & SRIVASTAVA, K.D. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. Plant Pathology 50:470-476. 2001.
- GOMES, F.B., MORAES, J.C., SANTOS, C.D. & GOUSSAIN, M.M. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. Scientia Agricola. 62:547-551. 2005.
- GOMEZ, K.A. & GOMEZ, A.A. Statistical Procedures for Agricultural Research, 2nd Edition, Wiley. 1994.
- GUÉVEL, M.H., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R.R. Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. European Journal Plant Pathology 119:429-436. 2007.
- HAMMOND-KOZACK, K., JONES, J.D.G. Responses to Plant Pathogens. In: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Current Opinion in Plant Biology 14: 177-193. 2003.
- HARMAN, G.E., HAYES, C.K., LORITO, M., BROADWAY, R.M., PIETRO, A. D., PETERBAUER, C. & TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83:313-318. 1993.
- HAUCK, P., THILMONY, R. & HE, S.Y. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 8577-82. 2003.
- HETZLER, J., EYAL, J., FEHRMANN, H., MEHTA, Y.R., KUSHNIR, U., ZEKARIA-OREN, J. & COHEN, L. Interaction between *Cochliobolus sativus* and wheat cultivars. In: Saunders, D.A. (ed) Wheat for the Non-Traditional Warmer Areas CIMMYT. 1991. pp. 266-283.

- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE - IRRI. Standard evaluation system for Rice in International Rice Testing Program. International Rice Research Institute. 1996.
- JARVIS, S.C. The uptake and transport of silicon by perennial ryegrass and wheat. *Plant Soil* 97:429-437. 1987.
- JOHNSON, R. & TAYLOR, A.J. Spore yield of pathogens in investigations of race specificity of host resistance. *Annual Review of Phytopathology* 17:97-119. 1976.
- JOHNSON, D.A. & WILCOXSON, R.D. Components of slow-rusting in barley infected with *Puccinia hordei*. *Phytopathology* 68:1470-1474. 1978.
- JOSHI, A.K. & CHAND, R. Variation and inheritance of leaf angle and its relationship with resistance to spot blotch in wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica* 124:283-291. 2002.
- JOSHI, A.K., KUMAR, S., CHAND, R. & ORTIZ-FERRARA, G. Inheritance of resistance to spot blotch caused by *Bipolaris sorokiniana* in spring wheat. *Plant Breeding* 123:213-219. 2004.
- KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 57:315-319. 1976.
- KESHAVARZI, M., SOYLU, S., BROWN, I., BONAS, U., NICOLE, M., ROSSITER, J. & MANSFIELD, J. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17:805-15. 2004.
- 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* 92:1095-1103. 2002.
- KORNDÖRFER, G.H., PEREIRA, H.S. & NOLA, A. Análise de silício: solo, planta e fertilizante. GPSi-ICIAG-UFU. 2004.
- KUMAR, J., HÜCKELHOVEN, R., BECKHOVE, U., NAGARAJAN, S.D. & KOGEL, K.H. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Phytopathology* 91:127-133. 2001.
- KUMAR, J., SCHÄFER, P., HÜCKELHOVEN, R., LANGEN, G., BALTRUSCHAT, H., STEIN, E., NAGARAJAN, S. & KOGEL, K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3:185-195. 2002.

- LAMB, C.J., LAWTON, M.A., DRON, M. & DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215-224. 1989.
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenases pool from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenases. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:87-92. 1996.
- LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I. & MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry* 266:1564-1573. 1991.
- LEUSCH, H.J. & BUCHENAUER, H. Effect of soil treatments with silica-rich lime fertilizers and sodium trisilicate on the incidence of wheat by *Erysiphe graminis* and *Septoria nodorum* depending on the form of N-fertilizer. *Journal. Plant Disease Protection*. 96:154-172. 1989.
- LEE, Y.K. & HWANG, B. K. Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in the intercellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infection. *Journal of Phytopathology* 144:79-87. 1996.
- LI, Q.F., MA, C.C. & SHANG, Q.L. Effects of silicon on photosynthesis and antioxidative enzymes of maize under drought stress. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 18:531-536. 2007.
- LIANG, X., DRON, M., CRAMER, C., DIXON, R.A. & LAMB, C. J. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during development and by environmental cues. *Journal of Biological Chemistry* 264:14486-14492. 1989.
- LIBERATO, J.R. Desenvolvimento e avaliação do Software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Tese de Doutorado – Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2003.
- LUO, Y. & ZENG, S.M. Simulation studies on epidemics of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) on slow-rusting cultivars and analysis of effects of resistance components. *Plant Pathology* 44:340-349. 1995.
- MCLUSKY, S.R., BENNETT, M.H., BEALE, M.H., LEWIS, M.J., GASKIN, P. & MANSFIELD, J.W. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3 ‘-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal* 17:523-534. 1999.
- MEHTA, Y.R. Manejo Integrado de Enfermedades de Trigo. CIAT/IAPAR. 1993.
- MEHTA, Y.R. Constraints on the integrated management of spot blotch of wheat. In: Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. And McNab A. (Eds)

- Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. CIMMYT. 1998. pp. 18-27.
- MEHTA, Y.R., RIEDE, C.R., CAMPOS, L.A.C. & KOHLI, M.M. Integrated management of major diseases in Brazil: An example for the Southern cone region of Latin America. *Crop Protection* 11:517-524. 1992.
- MENZIES, J.G., EHRET, D.L., GLASS, A.D.M. & SAMUELS, A.L. The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:403-414. 1991.
- MOHAMMADI, M., ROOHPARVAR, R. & TORABI, M. Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of yellow rust disease. *Mycopathologia* 154:119-126. 2002.
- NEUHAUS, J. Plant Chitinases. In: DATTA & MUTHUKRISHNAN (Eds.). *Pathogenesis-related proteins*. CRC Press. 1999. pp.77-106.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review Phytopathology* 17:203-232. 1979.
- PEIXOTO, P.H.P. Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. Tese de Doutorado. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 1998.
- PELLETIER, J.R. & FRY, W.E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* 79:511-517. 1989.
- PEREIRA, S.C. Silício como potencializador da atividade de enzimas de defesa à ferrugem em plantas de café e soja. Dissertação de Mestrado. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2007.
- PICININI, E.C. & FERNANDES, J.M. Controle da ferrugem da folha e da mancha bronzeada da folha de trigo pelo uso de fungicidas em tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira* 26:100. 2001.
- RAFI, M.M & EPSTEIN, E. Silicon absorption by wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* 211:223-230. 1999.
- RAFI, M.M., EPSTEIN, E. & FALK, R.H. Silicon deprivation causes physical abnormalities in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* 151:497-501. 1997.
- RAINS, D.W., EPSTEIN, E., ZASOSKI, R.J. & ASLAM, M. Active silicon uptake by wheat. *Plant and Soil* 280:223-228. 2006.

- REIS, E.M., CASA, R.T. Doenças do trigo. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.). Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. Agronômica Ceres, V.2. 2005. pp.631-638.
- REMUS-BOREL, W., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 108-115. 2005.
- RESENDE, R.S. Silício no manejo da antracnose do sorgo: componentes de resistência e respostas bioquímicas de defesa. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2007.
- ROBERTS, W. K., C.P. SELITRENNIKOFF. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134:169-176. 1988.
- RODGERS-GRAY, B.S., & SHAW, M.W. Effects of straw and silicon soil amendments on some foliar and stem-base diseases in pot-grown winter wheat. *Plant Pathology* 53:733-740. 2004.
- RODGERS-GRAY, B.S. & SHAW, M.W. Substantial reductions in winter wheat diseases caused by addition of straw but not manure to soil. *Plant Pathology* 49: 590-599. 2000.
- RODRIGUES, F.Á., DATNOFF, L.E., KORNDÖRFER, G.H., SEEBOLD, K.W. & RUSH, M.C. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease* 85:827-832, 2001a.
- RODRIGUES, F.Á., KORNDÖRFER, G.H., CORRÊA, G.F., BUKI, G.B., SILVA, O.A. & DATNOFF, L.E. Response of six gramineae species to application of calcium metasilicate. In: DATNOFF, L. E., SNYDER, G.H. & KORNDÖRFER, G.H. (Eds.) *Silicon in Agriculture. Studies in Plant Science*, Vol. 8. Elsevier Science. 2001b. pp. 378.
- RODRIGUES, F.Á., BENHAMOU, N., DATNOFF, L.E., JONES, J.B. & BÉLANGER, R.R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93:535-546, 2003a.
- RODRIGUES, F.Á., VALE, F.X.R., KORNDÖRFER, G.H., PRABHU, A.S., DATNOFF, L.E., OLIVEIRA, A.M.A. & ZAMBOLIM, L. Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection* 22:23-29, 2003b.
- RODRIGUES, F.Á., MCNALLY, D.J., DATNOFF, L.E., JONES, J.B., LABBÉ, C., BENHAMOU, N., MENZIES, J.G. & BÉLANGER, R.R. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94:177-183, 2004.
- RODRIGUES, F.Á., JURICK II, W.M., DATNOFF, L.E., JONES, J.B. & ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:144-159. 2005.

- ROTEM, J. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press. 1994.
- SAVANT, N.K., SNYDER, G.H. & DATNOFF, L.E. Silicon management and sustainable rice production. *Advances in Agronomy* 58:151-159. 1997.
- SCHENK, P.M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J.P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S.C. & MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 21:11655-11660. 2000.
- SEEBOLD, K.W., KUCHARSKU, T.A., DATNOFF, L.E., CORREA VICTORIA, F.J. & MARCHETTI, M.A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91:63- 69. 2001.
- SEEVERS, P.M., DALY, J.M. & CATEDRAL, F.F. The role of peroxidases isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology* 48:353-360. 1971.
- SHARMA, R.C., DUVEILLER, E. & AHMED, F. Helminthosporium leaf blight resistance and agronomic performance of wheat genotypes across warm regions of South Asia. *Plant Breeding* 123:520-524. 2004.
- SIDDIQUE, A.B., HOSSAIN, M.H., DUVEILLER, E. & SHARMA, R.C. Progress in wheat resistance to spot blotch in Bangladesh. *Journal Phytopathology* 154:16-22. 2006.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: An organism perspective. *Plant Growth Regulation* 12:303-312. 1993.
- SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. EMBRAPA. 1999.
- SOARES, R.M., MARINGONI, A.C. & LIMA, G.P.P. Ineficiência do acibenzolar-S-metil na indução de resistência de feijoeiro à *murcha-de-curtobacterium*. *Fitopatologia Brasileira* 29:373-377. 2004.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Artmed. 2004.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology 1:105. 2003.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isohering und kristallisation des g rungs ferments enolase. *Biochemistry Zoology* 310:384-421. 1941.
- WIESE, M.V. *Compendium of Wheat Diseases*. APS Press, 2nd Edition. 1987.

- YOSHIDA, S. Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bulletin of the National Institute of Agriculture Science* 15:1-58. 1965.
- YOSHIDA, S., OHINISHI, Y. & KITAGISHI, K. Chemical forms, mobility, and deposition of silicon in the rice plant. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 8:107-111. 1962.
- ZADOKS, J.C., CHANG, T.T. & KONZAC, C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415-421. 1974.
- ZIESLIN N. & BEM-ZAKEN, R. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in penduncles of rose flowers. *Plant Physiology Biochemistry*. 31:333-339. 1993.