

SANDRA CERQUEIRA PEREIRA

**SILÍCIO COMO POTENCIALIZADOR DA ATIVIDADE DE
ENZIMAS DE DEFESA À FERRUGEM EM PLANTAS DE CAFÉ
E SOJA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2007

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

T

P436s
2007

Pereira, Sandra Cerqueira, 1980-
Silício como potencializador da atividade de enzimas
de defesa à ferrugem em plantas de café e soja / Sandra
Cerqueira Pereira. – Viçosa, MG, 2007.
ix, 70f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 55-70.

1. Enzimas - Análise. 2. Silício. 3. Café - Resistência à
doenças e pragas. 4. Soja - Resistência à doenças e pragas.
5. Ferrugem-do-cafeeiro. 6. Ferrugem-da-soja. I. Universi-
dade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

SANDRA CERQUEIRA PEREIRA

**SILÍCIO COMO POTENCIALIZADOR DA ATIVIDADE DE
ENZIMAS DE DEFESA À FERRUGEM EM PLANTAS DE CAFÉ
E SOJA**

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

APROVADA: 31 de julho de 2007

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof.^a Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues
(Co-Orientador)

Prof. Laércio Zambolim
(Co-Orientador)

Prof.^a Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

*Aos meus pais, Osório e Olga, exemplos de vida,
integridade e sabedoria, meus eternos educadores.
Iluminaram meu caminho ensinando que a mais
importante forma de se viver é através da infindável
busca pelo conhecimento,*

MINHA HOMENAGEM

*Aos meus pais, Osório e Olga, e meus
irmãos, Leonardo e Soraia, pelo
apoio e compreensão, com amor,*

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado a chance de completar este trabalho e por ter me acolhido com um amor imensurável nas horas em que mais precisei.

Aos meus pais, Osório e Olga, meus irmãos Leonardo e Soraia, minha “tia-mãe” Maria da Penha e meu avô Sebastião, por todo incentivo, carinho, amor e, sobretudo pela compreensão nas horas mais difíceis, e toda família, que foram a base de minha vida e o caminho para esta conquista.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

A todos os professores que tanto contribuíram para minha formação acadêmica e crescimento profissional, além de todos os funcionários que fazem parte deste feliz ambiente em que pude conviver.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, ensinamentos, estímulo e, sobretudo, pela amizade.

Ao Professor Fabrício de Ávila Rodrigues, pela dedicação absoluta, afeto e todo conhecimento transmitido.

Ao Professor Laércio Zambolim e Dra. Eunize Maciel Zambolim, pela oportunidade e apoio incondicional.

Aos Professores Sebastião Tavares de Rezende e Efraim Lázaro Reis, pela colaboração indispensável e afeição.

À amiga e parceira de trabalho, Vivian Carré Missio com quem compartilhei buscas, dúvidas e descobertas e que tanto me ajudou, e aos amigos do Laboratório de Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitopatologia, em especial Dalila e Natália.

Às amigas e companheiras de bancada Angélica e Lílian, pelo apoio em todos os momentos, trocas de conhecimento, convívio, dificuldades e incertezas que enfrentamos juntas, sem contar as longas horas de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO: Fabrício, Fernanda, Thiago, Máira, Gepoliano, Isabela, Zaira, Fabrícia, Kênia, Luciana, Franciny, Eduardo, Liliane e Anderson, e aos demais colegas pela cooperação, convivência diária, respeito, afeição e pelos momentos de descontração.

Ao Senhor Fausto, que não mediu esforços para me ajudar, alegrar (“só Jesus, ta ligado”) e pela amizade verdadeira, e aos funcionários Eduardo, Bruna, Naldo, Sandra, Ricardo, Camila, Alessandra, Edson, Gláucia e Marlene, pela respeitosa convivência e carinho.

Às amigas do curso de Bioquímica Agrícola Ana Paula, Solange, Eleonice e Eliene, por todo carinho e ajuda, pela amizade e companheirismo, além das horas e horas de estudo e convívio no decorrer do curso.

Aos colegas do Laboratório de Proteção de Plantas, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, Laboratório de Proteína, Laboratório Biomol e Laboratório de Proteômica, em especial Jonas, Toninho, Sérgio Milagres, Robson, Márcia Flores, Daniela, Rita, Márcia, Clever e Paulo, pelo auxílio contínuo e amizade.

Ao grande amigo e irmão Abelardo pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela amizade verdadeira, pelo socorro nas horas ruins e pelas boas risadas e aventuras vividas, por ser um exemplo de ser humano.

Às amigas e irmãs Clarisse, Caroline, Raquel, Andréia, Mariana, Fernanda, Cláudia, Mariana Mayra, Silvana e ao amigo Nilo pela grande e eterna amizade, compreensão, apoio imprescindível, além das ocasiões felizes e inesquecíveis que vivemos juntos.

Aos amigos Felipe, Flávio, Patrick e Vagner, pela convivência e ajuda, além da paciência e por me permitirem fazer da casa deles a minha casa, em especial ao Élcio, que foi meu ombro amigo muitas e muitas vezes, ouvindo e aconselhando, além de todos os amigos do Edifício Rayane.

Finalmente, aos demais amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja direta ou indiretamente, com palavras de consolo e estímulo, ou trabalhando lado a lado na construção deste sonho que se realiza, a minha eterna e sincera gratidão.

BIOGRAFIA

SANDRA CERQUEIRA PEREIRA, filha de Osório Berto Pereira e Olga Cerqueira Pereira, nasceu na cidade de Manhuaçu, MG, no dia 29 de dezembro de 1980.

Em 2004, graduou-se em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), nas modalidades Licenciatura e Bacharelado.

Em 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em nível de mestrado na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1. Aspectos gerais sobre a cultura do cafeeiro e a ferrugem	04
2.2. Aspectos gerais sobre a cultura da soja e a ferrugem asiática	07
2.3. A utilização do Acibenzolar-S-Metil na indução de resistência	09
2.4. Ativação de mecanismos de defesa	11
2.5. Utilização de silicatos na indução de resistência a doenças	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Ensaio em casa de vegetação	19
3.1.1. Cultura do cafeeiro	19
3.1.2. Cultura da soja	20
3.2. Ensaio bioquímico	21
3.2.1. Cultura do cafeeiro	21
3.2.2. Cultura da soja	22
3.3. Determinação da atividade enzimática em plantas de café e soja	22
3.3.1. β -1,3-glucanases	22
3.3.2. Quitinases	23
3.3.3. Lipoxigenases	24
3.3.4. Fenilalanina amônia-liase	25
3.3.5. Peroxidases	26
3.3.6. Polifenoloxidasas	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Experimento com Cafeeiro	29
4.1.1. Severidade da ferrugem	29
4.1.2. Teores foliares de silício e potássio	30
4.1.3. Atividade enzimática	31
4.1.3.1. β -1,3-glucanases	31
4.1.3.2. Quitinases	32

4.1.3.3. Lipoxigenases.....	33
4.1.3.4. Fenilalanina amônia-liase.....	34
4.1.3.5. Peroxidases.....	36
4.1.3.6. Polifenoloxidasas	37
4.2. Experimento com Soja	38
4.2.1. Severidade da ferrugem asiática	38
4.2.2. Teores foliares de silício e potássio	40
4.2.3. Atividade enzimática.....	40
4.2.3.1. β -1,3-glucanases.....	40
4.2.3.2. Quitinases.....	41
4.2.3.3. Lipoxigenases.....	43
4.2.3.4. Fenilalanina amônia-liase.....	44
4.2.3.5. Peroxidases.....	45
4.2.3.6. Polifenoloxidasas	47
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

PEREIRA, Sandra Cerqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2007.

Silício como potencializador da atividade de enzimas de defesa à ferrugem em plantas de café e soja. Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues, Laércio Zambolim e Eunize Maciel Zambolim.

A ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) têm reduzido significativamente a produtividade, respectivamente, das culturas do café e da soja. O silício (Si) é considerado um elemento benéfico às plantas, pois aumenta a resistência delas às doenças e ao ataque de pragas. Em resposta a infecção por patógenos, as plantas ativam diferentes mecanismos de defesa entre eles o aumento na atividade de enzimas como as β -1,3-glucanases (GLU) e as quitinases (QUI) que catalisam a hidrólise de componentes da parede celular fúngica; a fenilalanina-amônia-liase (PAL) e as peroxidases (POD) que são importantes no processo da lignificação; as polifenoloxidasas (PPO) que catalisam a formação de quinonas e as lipoxigenases (LOX) que catalisam a degradação de ácidos graxos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar se a aplicação foliar de silicato de potássio (SP) reduziria a severidade dessas ferrugens potencializando o aumento na atividade das enzimas GLU, QUI, PAL, POD, PPO e LOX. Plantas de soja e de café inoculadas ou não inoculadas com *P. pachyrhizi* e *H. vastatrix*, respectivamente, foram pulverizadas com SP via foliar. Utilizaram-se como tratamentos controle, a pulverização com água e com o indutor de resistência Acibenzolar-S-Metil (ASM). A aplicação foliar de SP e de ASM reduziu a severidade das ferrugens em comparação ao tratamento com água. As atividades das enzimas GLU, QUI, PAL, POD, PPO e LOX foram exclusivamente potencializadas após a infecção pelos patógenos. A redução na severidade das ferrugens deve-se à polimerização do silicato de potássio na superfície foliar que possivelmente, dificultou a penetração dos fungos ou afetou a viabilidade das suas estruturas reprodutivas.

ABSTRACT

PEREIRA, Sandra Cerqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2007.
Silicon as a potentiater of the activity of enzymes related to the defense to rust in coffee and soybean plants. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Co-Advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues, Laércio Zambolim and Eunize Maciel Zambolim.

The coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) and asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) can significantly reduce yield, respectively, on coffee and soybean crops. Silicon (Si) is a beneficial element to plants because it increases host resistance to pests and diseases. In response to infection by pathogens, plants activate many mechanisms of defense such as an increase in the activity of the enzymes β -1.3-glucanases (GLU) and chitinases (QUI) that degrade fungus cell wall; phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidases (POD) which are important in the lignification; polyphenoloxidases (PPO) that catalyzes the formation of quinones and lipoxygenases (LOX) that degrade fatty acids. In this context, the present study aimed to investigate if the application of potassium silicate (PS) can reduce rust severities on coffee and soybean plants mainly through the increase in the activity of GLU, QUI, PAL, POD, PPO and LOX. Soybean and coffee plants inoculated or not inoculated with *P. pachyrhizi* and *H. vastatrix*, respectively, were sprayed with PS. As control treatments, plants were sprayed with water and Acibenzolar-S-Methyl (ASM). The foliar applications of PS and ASM decreased rust severities on both coffee and soybean plants. The activity of GLU, QUI, PAL, POD, PPO and LOX increased upon pathogens infection. The reduction on rust severities was due to the polymerization of PS on leaf surface that possibly affected fungus penetration or somehow the viability of their reproductive structures.

1. INTRODUÇÃO

O café e a soja são importantes culturas para o país. São produtos de exportação gerando divisas e contribuindo para o aumento do Produto Interno Bruto. Geram emprego na agricultura, principalmente o café, ajudando na fixação do homem ao campo, pois mais de 70% das propriedades de café do país tem em média 15 a 30 mil pés de café. A soja pode ser empregada na alimentação de seres humanos (farinha, carne e óleo) e animais (farelo), podendo ainda ser aplicada na produção do biodiesel, um combustível que visa à redução da poluição nas grandes metrópoles. Entretanto, torna-se necessária a adoção de um conjunto de medidas integradas para dar sustentabilidade a tais culturas. No tocante às doenças, têm-se verificado sérias perdas, sendo que a ferrugem é a principal causa de inúmeros prejuízos.

O emprego de fungicidas é a única medida disponível para o controle da doença e como consequência, exige altos investimentos com defensivos agrícolas. Além do mais, a dificuldade de se desenvolver variedades com resistência completa à ferrugem causada pelos fungos *Phakopsora pachyrhizi* e *Hemileia vastatrix* para o benefício dos produtores de soja e café, respectivamente, ainda demandará vários anos de pesquisa, devido a grande variabilidade fisiológica dos patógenos. A busca por medidas de controle alternativo, como a resistência induzida por nutrientes na defesa da planta, que não polui e que pode ser empregada de imediato, constitui uma forte demanda do setor produtivo e um desafio à pesquisa.

A nutrição de plantas determina em grande parte a sua resistência ou susceptibilidade a doenças, sua estrutura morfológica ou histológica, a função de tecidos para rápida ou lenta patogênese, a virulência e habilidade do patógeno para sobreviver. Os elementos minerais são necessários para síntese de barreiras químicas e físicas, ou mudança de substâncias ao redor do sítio de infecção e estão envolvidos em todo mecanismo de defesa das plantas como um componente integral da célula, substrato, enzimas, ou como ativadores, inibidores, e reguladores do metabolismo. Uma planta estressada nutricionalmente é mais susceptível, pois se altera a resistência do hospedeiro devido à mudança em caminhos metabólicos que afeta a produção de barreiras mecânicas, fisiológicas ou compostos inibitórios, dificultando a inibição da germinação, crescimento, penetração ou atividade enzimática do patógeno.

O silício (Si) é considerado como elemento benéfico para as plantas. A presença desse elemento tem sido relacionada principalmente ao aumento da resistência contra pragas e doenças e tolerância à toxidez. Os efeitos do Si são usualmente expressos sob condições de estresse, tanto abiótico como biótico. Estruturalmente, proporcionam mudanças anatômicas nos tecidos, como células epidérmicas com a parede celular mais espessa devido à deposição de sílica, favorecendo a melhor arquitetura das plantas, além de aumentar a capacidade fotossintética e resistência às doenças. O Si ativa genes envolvidos na produção de compostos secundários do metabolismo, como os polifenóis e enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa, além da produção suplementar de toxinas que podem agir como substâncias inibidoras ao patógeno.

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Cada interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. Os fatores de resistência incluem aqueles já presentes nas plantas antes do contato com os patógenos ou os que se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos. Dentre esses fatores estão as respostas bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta. Neste contexto, várias enzimas têm sua produção e/ou atividade alteradas nas plantas em resposta à presença de patógenos.

As β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) catalisam a hidrólise das β -1,3-glucanas. As quitinases (EC 3.2.1.14) catalisam a hidrólise da quitina (um polímero de N-acetilglucosamina). A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) exerce papel fundamental catalisando a conversão de L-fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico. As peroxidases (EC 1.11.1.7) catalisam a oxidação de componentes celulares, tais como H₂O₂ ou peróxidos orgânicos. As polifenoloxidasas (EC 1.10.3.1) catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio, sendo a primeira corresponde à hidroxilação de monofenóis formando *orto*-difenois e a segunda à oxidação de *orto*-difenois formando *orto*-quinonas. As lipoxigenases (EC 1.13.11.12) catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes.

É de suma importância que se intensifiquem as pesquisas no que dizem respeito ao emprego da tecnologia baseada na suplementação com Si, que é uma técnica sustentável com enorme potencial para diminuir o uso de agroquímicos e aumentar a produtividade por meio de uma nutrição mais equilibrada e fisiologicamente mais eficiente na indução de resistência a doenças. Com o propósito de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a relação existente entre o processo de resistência das culturas de café e soja e a atividade de enzimas envolvidas no sistema de defesa. Plantas inoculadas e não inoculadas com os respectivos fungos causadores da ferrugem do café (*H. vastatrix*) e ferrugem asiática da soja (*P. pachyrhizi*) foram tratadas com silicato de potássio em aplicação via foliar, para comparação com plantas previamente tratadas com água e plantas tratadas com um indutor de resistência reconhecido comercialmente Acibenzolar-S-Metil (ASM).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais sobre a cultura do cafeeiro e a ferrugem

O café é economicamente o segundo mais importante produto comercializado no mundo, além disso, é um dos principais produtos agrícolas de exportação brasileira. Destaca-se por sua ampla área de cultivo, apresentando, portanto, grande importância econômica. Nos últimos dez anos, o Brasil colheu em média cerca de 30 milhões de sacas de café por ano. Minas Gerais é o maior Estado produtor, com cerca de 50% da produção nacional, seguido pelos Estados do Espírito Santo, São Paulo e Paraná. Em média, o Brasil exporta um volume de café entre 70 e 80 milhões de sacas de 60 kg, contribuindo com uma participação de 23% no mercado mundial. As duas espécies de café crescentes comercialmente no Brasil são *Coffea arábica* L. (Café Arábica) e *Coffea canephora* L. (Café Robusta), as quais representam 70% e 30%, respectivamente, da produção mundial (MATIELLO et al., 2002).

A cafeicultura impõe um constante desafio aos produtores, devido ao grande número de doenças e pragas que ocorrem durante praticamente todo o ciclo. Como toda cultura em geral, está sujeita à incidência de problemas fitossanitários de origem biótica e abiótica que atacam as diferentes partes da planta, influenciando direta ou indiretamente na produção. As limitações fitossanitárias têm-se acentuado com a expansão da cultura nos mais variados tipos de clima e solo. Os incentivos ao aumento de produtividade, da qualidade do produto, de competitividade e de lucro, agregam-se aos fatores de geração das ações de risco ambiental, uma vez que incentivam a intensificação da exploração do ambiente natural e o uso de tecnologias que, se usadas de forma incorreta, levarão à degradação dos ecossistemas e à diminuição da qualidade do meio ambiente.

Muitos países estão envolvidos na produção, comercialização e consumo de café. O produto é muito apreciado devido a características organolépticas e efeito estimulante. Contudo, um dos grandes obstáculos à exploração da cafeicultura é a susceptibilidade das plantas à ferrugem. No Brasil, estima-se em média 30% de perdas na produção quando as condições climáticas tornam-se favoráveis ao patógeno (ZAMBOLIM et al., 2002). Sob condições de estiagem prolongada, nos períodos de maior severidade, as perdas na produção podem chegar a mais de 50% (ZAMBOLIM et al., 1997). A ferrugem ataca as plantações de café em todas as

regiões do mundo onde esta rubiácea é cultivada. No Brasil, foi constatada em 1970, ao sul da Bahia. Quatro meses depois a doença foi encontrada em todas as lavouras de café do país. Logo se disseminou por todos os países produtores de café das Américas do Sul, Central e Norte (ZAMBOLIM et al., 2005a).

A principal vantagem do cultivo da espécie *Coffea arabica* L. sobre a espécie *Coffea canephora* L. é a superioridade, mundialmente conhecida, da sua qualidade de bebida. Entretanto, a maior desvantagem é sua grande susceptibilidade a várias doenças e pragas. Dentre elas, a principal doença é a ferrugem, que é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., que parasita a folha do cafeeiro (VÁRZEA et al., 2002). O fungo *H. vastatrix* foi detectado pela primeira vez no ano de 1869, no Ceilão, atual Sri Lanka, ocasionando o fim do cultivo do cafeeiro e a mudança de hábito de consumo de café para o chá nas ilhas britânicas em menos de 20 anos (BERGAMIN FILHO & KIMATI, 1995). No Brasil, foram relatadas 12 raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cafeeiros, sendo predominante a raça II (ZAMBOLIM et al., 2005b). A cultivar Catuaí Vermelho corresponde a uma recombinação resultante de um cruzamento artificial entre as variedades Caturra Amarelo e Mundo Novo de *C. arabica* (FAZUOLI et al., 2002). É uma cultivar que apresenta ampla capacidade de adaptação e alta qualidade de bebida, entretanto, é susceptível a maioria das raças de *H. vastatrix*.

O fungo *H. vastatrix*, pertence à ordem Uredinales e família Pucciniaceae, sendo parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. As características que distinguem o gênero *Hemileia* são: penetração e esporulação através dos estômatos e uredósporos reniformes equinulados dorsalmente e lisos dorsalmente (ZAMBOLIM et al., 2005a). *H. vastatrix* se desenvolve na superfície abaxial das folhas, a partir da germinação dos uredósporos na presença de água e temperatura favorável, podendo emitir até três tubos germinativos. Há formação de apressório na extremidade do tubo germinativo, usualmente sobre um estômato, em seguida dando origem a hifa de penetração (*peg* de penetração) a qual após atravessar o ostíolo do estômato, diferencia-se em vesícula sub-estomática. O desenvolvimento subsequente da hifa de infecção na câmara sub-estomática leva à colonização das células subsidiárias e do mesófilo, com formação do micélio intercelular e em seguida, dos haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes pelo patógeno, dentro das células do hospedeiro (ZAMBOLIM et al., 2002; 2005a).

O vento é o principal agente de disseminação da ferrugem do cafeeiro a longas distâncias, sendo que a curtas distâncias a chuva tem papel primordial. As condições favoráveis à germinação dos uredósporos ocorrem à noite, pois a luz inibe a germinação e o crescimento do tubo germinativo. Temperatura em torno de 22°C, e altitudes de 550 até 850m favorecem a doença. Os sintomas podem ser observados na face inferior das folhas, onde aparecem manchas de coloração amarelo-pálida, de aspecto pulverulento (uredósporos) e coloração amarelo-alaranjada características. Na face superior das folhas observam-se manchas cloróticas amareladas, que posteriormente necrosam. Os principais prejuízos ocasionados pela ferrugem consistem na redução de área foliar, pela formação de lesões e queda precoce das folhas, assim como a seca de ramos laterais, com gradual deformação das plantas. Quando a desfolha ocorre antes do florescimento, pode interferir no desenvolvimento dos botões florais e na frutificação, e se ocorrer durante a formação dos frutos pode haver má formação de grãos, afetando a produtividade (ZAMBOLIM et al., 2005a).

A ocorrência e a intensidade de doenças dos cafeeiros são influenciadas por fatores como a virulência do patógeno, a resistência das plantas, o estado nutricional e ainda, os fatores ligados ao ambiente, como temperatura, chuva, intensidade de ventos, umidade relativa, luz e disponibilidade de nutrientes no solo (CARVALHO et al., 2002). Boa parte desses fatores pode ser manejada de alguma forma, obtendo-se diminuição do inóculo, aumento na resistência dos cafezais às doenças ou promoção de condições menos favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. Na atualidade, as medidas de controle se baseiam quase exclusivamente no método químico, podendo-se citar, a aplicação via solo, com uso de fungicidas sistêmicos granulados, que podem ser misturados com inseticidas, e a aplicação via foliar, por meio da utilização de produtos de contato e/ou sistêmicos (SILVA et al., 1997).

O uso indiscriminado e excessivo de agroquímicos, o cultivo intenso e a perda de vegetação têm levado ao desequilíbrio ecológico do solo, resultando no decréscimo da contribuição dos processos biológicos para a nutrição de plantas e para o controle biológico natural de pragas e doenças, além de outros efeitos, como a poluição ambiental e a contaminação de alimentos e matérias-primas. Conscientes disso, os pesquisadores buscam hoje soluções mediante o manejo integrado da cultura do cafeeiro, visando ao controle dos problemas fitossanitários que afetam a plantação, com a redução dos impactos causados ao agroecossistema. Para tanto, uma alternativa adequada e eficiente seria o desenvolvimento de cultivares

resistentes, o que reduziria o número de pulverizações com fungicidas, substituindo, de maneira vantajosa, as variedades tradicionais altamente susceptíveis. No entanto, o contínuo aparecimento de novas raças tem ocasionado a quebra de resistência das cultivares produzidas pelos melhoristas com o intuito de conseguir resistência duradoura a este patógeno (VÁRZEA et al., 2002).

2.2. Aspectos gerais sobre a cultura da soja e a ferrugem asiática

A soja é originária das regiões norte e central da China, onde foi domesticada há cerca de 5 mil anos, o que faz dela uma das plantas cultivadas mais antigas. Embora natural da China, os Estados Unidos hoje lideram sua produção. No início do século XX, os pesquisadores descobriram o valor que a soja oferecia em termos de proteína e óleo, assim elevando seu prestígio como alimento humano. A produção de soja como mercadoria de qualidade expandiu a partir da década de 20. Dentre os grandes produtores mundiais de soja, o Brasil figura como o que apresenta as melhores condições de expandir a produção e promover o esperado aumento da demanda mundial. O crescimento e aumento da capacidade competitiva da soja brasileira sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilidade de tecnologias do setor produtivo (EMBRAPA, 2007).

O Brasil é responsável por cerca de 30% da produção mundial, com a safra de 2005 ao redor de 51 milhões de toneladas. O país é o segundo maior produtor e exportador de soja em grão, farelo e óleo. O chamado Complexo Soja é um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira e exportou cerca de US\$8 bilhões em 2005, colocando o país na liderança mundial nas exportações do setor em valor (ABIOVE, 2007). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o país produziu cerca de 80 milhões de toneladas de soja em 2005, volume que esteve disponível na temporada comercial de agosto de 2005 a setembro de 2006. A soma de 107 milhões de toneladas da safra sul-americana, 17 milhões de toneladas da China e 17 milhões do resto do mundo, resultam em uma produção global igual a 221 milhões de toneladas de soja na temporada 2005/2006 (ROESSING, 2007).

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma planta pertencente à família das leguminosas. É uma excelente fonte de proteína de uso animal e humano (GUIMARÃES et al. 2001) e sua cultura representa um dos elementos mais fortes da

economia do Brasil, em função do seu grande valor sócio-econômico, determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos, além da expressão no mercado interno e externo. Por esses motivos recebe intensa atenção da pesquisa, para obtenção de informações que possibilitem aumentos na produtividade. Para que se consigam maiores rendimentos por área, é indispensável, além do emprego de técnicas adequadas de cultivo, a utilização de sementes de alta qualidade, expressa pelos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (BRACCINI, 2003).

Apesar da grande evolução do melhoramento de soja no Brasil, a monocultura e a adoção de manejo inadequado têm favorecido ao surgimento de doenças. O crescimento da cultura da soja nas regiões de cerrado do Brasil central permitiu, sob condições climáticas favoráveis, a ocorrência de grande número de patógenos, principalmente fúngicos. Uma das doenças mais importantes neste setor é a ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, que possui alto potencial de dano à lavoura, podendo causar rápido amarelecimento e queda prematura de folhas, o que prejudica a formação de grãos (YORINORI et al., 2003). Foi identificada pela primeira vez no Continente Americano em março de 2001 no Paraguai e em maio do mesmo ano, no Brasil, a oeste e norte do Paraná (ALMEIDA et al., 2005). Em função de sua fácil disseminação com o vento pode ser encontrada em praticamente todas as regiões produtoras do Brasil com reduções de até 75% de produtividade (YORINORI, 2002).

O fungo *P. pachyrhizi* pertence à ordem Uredinales e família Phakopsoraceae, sendo parasita biotrófico (ZAMBENEDETTI, 2005). A penetração na folha do hospedeiro é direta entre as junções da célula epidérmica. Para germinar os uredósporos precisam formar um tubo germinativo curto, delimitado por um apressório, terminando em um septo. Da base do apressório, desenvolve um *peg* de penetração que penetra pela cutícula do hospedeiro e pela parede da célula epidérmica. Uma vez dentro da célula epidérmica o *peg* de penetração expande-se para formar a vesícula epidérmica e logo depois a hifa de penetração que atravessa a célula da epiderme e emerge no espaço intercelular e no tecido do mesófilo. Um septo é formado na porção intercelular da hifa de penetração, enquanto a hifa primária se estende para formar a hifa secundária (ZAMBENEDETTI et al., 2007).

Neste tipo de penetração pode ocorrer uma série de eventos que levam à formação de barreiras estruturais pela planta, os quais podem levar à resistência ao patógeno. Os sintomas podem ser observados de maneira mais característica nas

folhas, iniciando como minúsculos pontos (no máximo 1 mm de diâmetro) mais escuros que o tecido sadio da folha, com correspondente protuberância (urédio) na face inferior da folha. Progressivamente os urédios abrem-se em um minúsculo poro, expelindo os uredósporos. À medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha ao redor dos urédios adquire coloração castanha formando lesões visíveis em ambas as faces da folha. Os urédios que deixaram de esporular apresentam pústulas, nitidamente, com os poros abertos. As folhas infectadas amarelam, secam e caem prematuramente (ALMEIDA et al., 2005).

O controle da ferrugem asiática requer diversas medidas conjuntas. Quando a doença já está instalada, o uso de fungicidas é, até o momento, o principal método de controle. Outras medidas de controle são: utilizar cultivares mais precoces, semeadas no início da época recomendada para cada região; evitar o prolongamento do período de semeadura; vistoriar as lavouras; observar se há condições de temperatura e alta umidade, favoráveis ao patógeno (YORINORI & WILFIDO, 2002). Ainda não se têm entre as cultivares recomendadas materiais com bom nível de resistência, devido em parte à recente ocorrência da doença no país e ao fato do fungo possuir diversas raças com genes múltiplos de virulência (SINCLAIR & HARTMAN, 1995). Apesar de todos os esforços da área de melhoramento genético e biotecnológico na obtenção de cultivares resistentes às doenças mais destrutivas, a cultura da soja ainda não pode abrir mão da proteção química com fungicidas, pois só produz econômica e estavelmente se for adequadamente protegida (AZEVEDO, 2001).

2.3. A utilização do Acibenzolar-S-Metil na indução de resistência

A constante necessidade humana de controlar as doenças ocorrentes em plantas exploradas economicamente tem ocasionado graves desequilíbrios no ambiente, devido ao uso indiscriminado de defensivos químicos, resultando na contaminação de alimentos, animais e reservas hídricas, além de provocar a seleção de novas raças mais agressivas (BONALDO et al., 2005). E neste contexto, uma sociedade cada vez mais preocupada com o meio ambiente, a utilização de produtos ecologicamente corretos, de baixo custo e com bom nível de controle, representa um avanço na agricultura (GUZZO et al., 2001). A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos representa um método alternativo no controle de doenças, a qual ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. A defesa induzida envolve um

sistema de vigilância da planta hospedeira, que reconhece de alguma forma o contato estabelecido com o patógeno, seguido pela transdução de sinais, alertando sobre a presença do mesmo, e por fim, envolve a expressão de genes relacionados à defesa (LAMB et al., 1989).

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Cada interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. As plantas podem se defender dos agentes fitopatogênicos passiva ou ativamente. Os fatores de resistência pré-formados incluem aqueles já presentes nas plantas antes do contato com os patógenos. No caso dos pós-formados, estes se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos. Dentre esses fatores estão as respostas bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes externos (indutores), sem qualquer alteração do genoma da planta, sendo estes agentes bióticos ou abióticos (RESENDE et al., 2004). Pode ocorrer em condições controladas e também no campo, além de exibir vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematóides; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural da proteção; transmissão por enxertia; economia metabólica e utilização do potencial genético para resistência em todas as plantas susceptíveis (PASCHOLATI, 2002). Como desvantagens: é resistência parcial, incompleta e que pode requerer reativações temporárias. Por outro lado, por ser parcial e inespecífica, a resistência induzida não impõe pressão de seleção sobre o patógeno, dificultando assim a quebra de resistência (SILVA & RESENDE, 2001).

Resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI) são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes, no sentido de que as plantas após exposição a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em outros locais distantes dele, de forma mais ou menos generalizada (STICHER et al., 1997). Assim, tem-se assumido

que a RSA envolve o acúmulo de proteínas-RP (proteínas relacionadas à patogênese) como mecanismos induzidos de defesa da planta, sendo sua indução salicilato-dependente, podendo resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) na planta que sofreu indução e é geralmente induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso da RSI, não há acúmulo de proteínas-RP, a planta que sofreu indução não exibe alterações, o agente indutor é usualmente um microorganismo não-patogênico e sua indução não é salicilato-dependente, havendo outra rota de sinalização associada à jasmonatos e etileno (BONALDO et al., 2005).

Entre os agentes químicos abióticos, o produto Acibenzolar-S-Metil (ASM) interfere nos processos fisiológico-bioquímicos das plantas, sendo um promissor indutor de resistência vegetal, possibilitando a proteção em condições de campo, contra um amplo espectro de patógenos em diversos cultivos (GÖRLACH et al., 1996). Em 2001 essa substância foi registrada no Brasil, sob a marca comercial Bion[®] como o primeiro representante de uma nova classe de produtos para a proteção de diversas culturas, os ativadores de plantas (CASTRO, 2002). A molécula do produto é um éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7carbotióico, a qual tem sido empregada como indutor de resistência em várias espécies vegetais como pepino, fumo, tomate, trigo e inclusive café com redução da severidade da doença em até 60% (NOJOSA, 2003). O referido composto tem se mostrado mais eficiente na indução de resistência quando comparado ao ácido salicílico (AS), além de apresentar baixa fitotoxidez (GÖRLACH et al., 1996). Apesar de apresentar mecanismo de ação como mensageiro secundário semelhante ao AS, o ASM parece atuar independente de qualquer molécula sinal, levando à expressão de genes relacionados à RSA (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998).

2.4. Ativação de mecanismos de defesa

Diversos mecanismos podem ser ativados durante o fenômeno de indução de resistência (CAVALCANTI et al., 2005). A comparação dos níveis de síntese de proteínas entre tecidos infectados e sadios revela que os tecidos infectados sofrem aumento considerável desta atividade. A planta procura ativar todas as linhas de defesa para evitar o estabelecimento de relações parasitárias e o patógeno tenta anular o efeito inibitório gerado (GÓMEZ-GOMEZ, 2004). Dentre algumas proteínas produzidas ligadas à reação de hipersensibilidade, encontram-se proteínas

relacionadas com a patogênese (RESENDE et al., 2000). Enzimas envolvidas na respiração, enzimas envolvidas com a fotossíntese e enzimas relacionadas com o metabolismo de fenilpropanóides exibem aumentos na atividade em tecidos infectados e têm sido sistematicamente correlacionadas com a ativação de mecanismos de reparo dos tecidos infectados e/ou injuriados (LEITE & PASCHOLATI, 1995).

As β -1,3-glucanases (1,3- β -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.39) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) catalisam a hidrólise das β -1,3-glucanas. São comumente encontradas nas plantas e essa evidente abundância está relacionada com o envolvimento no mecanismo de defesa à ação de patógenos (SIMMONS, 1994). São importantes para diversos processos fisiológicos nos vegetais (MOROHASHI & MATSUSHIMA, 2000). O tipo de infecção e a histologia têm indicado que a resistência da planta à ferrugem das folhas está intimamente associada a um mecanismo de resposta de hipersensibilidade (HR) (JACOBS et al., 1996). O HR, por sua vez, é acompanhado pela indução de numerosos componentes de defesa, ou seja, a acumulação de proteínas relacionadas com a patogênese. Entre elas, as β -1,3-glucanases tem recebido considerável atenção por ser forte inibidora do crescimento de muitos fungos em cultura, indicando que elas podem ter uma função direta como antifúngicas (JI & KUC, 1996; MAUCH et al., 1988).

Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas (flores, folhas e raízes) e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que os polímeros acima se mostram como os principais constituintes da parede celular fúngica, provocando a liberação de elicitores oligossacarídicos (HAM et al., 1991; OKINAKA et al., 1995). O potencial antimicrobiano das β -1,3-glucanases tem sido testado com sucesso *in vivo* pela manipulação de sua expressão em plantas transgênicas (JACH et al., 1995). Relativamente pouco se sabe a respeito do tempo de indução do mecanismo de resposta de defesa durante as infecções de ferrugem (ANGUELOVA-MERHAR et al., 2001). Além disso, a atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta à infecção e a tratamentos hormonais e químicos. Exibem formas ácidas e básicas. As formas básicas ocorrem, de modo geral, intracelularmente (nos vacúolos) e as ácidas, extracelularmente (nos espaços intercelulares) (LEITE & PASCHOLATI, 1995).

As quitinases (poly [1,4-(*N*-acetyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolase, EC 3.2.1.14) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) catalisam a hidrólise da quitina (um polímero de *N*-acetilglucosamina). Nenhum substrato para este grupo de enzimas tem sido identificado em plantas, entretanto, quitina é um componente da parede celular de fungos e exoesqueletos de artrópodes, organismos que incluem muitos patógenos e pragas importantes (WEN-CHI et al., 1998). As plantas respondem ao ataque de microorganismos, insetos e animais pela indução de genes que codificam diversas proteínas, que podem estar relacionadas com a defesa (BOL et al., 1990; BOWLES, 1990; COLLINGE et al., 1993; DIXON & HARRISON, 1990; LINTHORST, 1991; PUNJA & ZHANG, 1993). Estudos com plantas transgênicas mostram aumento na síntese de quitinases relacionado com a diminuição dos danos causados pelos patógenos (BROGLIE et al., 1991).

Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas (folhas, flores e raízes) e são induzidas como resultado de infecções patogênicas bem como por agentes abióticos (LEE & HWANG, 1996; NEUHAUS, 1999). É um potente inibidor do crescimento de fungos em cultura, o que indica sua atuação antifúngica nas plantas (MAREK et al., 2000). Além disso, a atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta à infecção e a tratamentos hormonais e químicos. As quitinases atuam em pH ácido e básico. As formas básicas ocorrem, de modo geral, intracelularmente (nos vacúolos) e as ácidas, extracelularmente (nos espaços intercelulares). Vários trabalhos indicam que as formas extracelulares possuem uma função imediata na defesa das plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (ação fúngica). Esta ação provoca a liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes fúngicas (LEAH et al., 1991; LEITE & PASCHOLATI, 1995; MOHAMMADI et al., 2002).

As lipoxigenases (linoleate:oxygen 13-oxidoreductase, EC 1.13.11.12) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) estão amplamente distribuídas em plantas e animais superiores. Catalisam a adição do oxigênio molecular ao sistema cis, cis-1,4-pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes e contêm ferro não-heme, necessário para sua atividade catalítica (BUNKER et al., 1995; MACK et al., 1987; VICK & ZIMMERMAN, 1987). As lipoxigenases vegetais utilizam ácido linolênico ou ácido linoléico como substrato e estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, como o ácido jasmônico (FARMER & RYAN, 1992; FORTUNATO et al., 2007), crescimento e

desenvolvimento (SIEDOW, 1991), senescência (ROUET-MAYER et al., 1992), germinação de sementes (PARK et al., 1994), resposta a ferimento (VIEIRA et al., 2001), reserva vegetativa (STEPHENSON et al., 1998) e resistência a insetos e patógenos (BELL & MULLET, 1993; BOHLAND et al., 1997; FIDANTSEF & BOSTOCK, 1998; HEITZ et al., 1997; SARAVITZ & SIEDOW, 1996).

Durante um processo de estresse ocorrem danos físicos às células e, em razão disso, uma degradação seqüencial de lipídeos pode ser iniciada pelas lipoxigenases. Essas formam hidroperóxidos dos ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos (SILVA et al., 2001). Dentre estes, estão a traumatina, envolvida na resposta a ferimentos e na indução da divisão celular e formação de calos (SIEDOW, 1991), o ácido jasmônico, associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (MELAN et al., 1993), os aldeídos voláteis e oxiácidos, que causam efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos (VAUGHN & GARDNER, 1993), insetos e protozoários (CROFT et al., 1993).

A fenilalanina amônia-liase (L-phenylalanine ammonia-lyase EC 4.3.1.5) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) exerce papel fundamental catalisando a conversão de L-fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico (SCHUSTER & RÉTEY, 1995; SMITH & BANKS, 1986), numa reação de deaminação (CAMPOS et al., 2003). Esta reação é considerada um passo essencial na via de fenilpropanóides porque provê um ponto de entrada para a biossíntese de um grande número de produtos derivados do esqueleto de fenilpropano e tem sido extensivamente estudada pela importante participação no fenômeno de resistência sistêmica adquirida (MORAES, 1998). Estes produtos incluem lignina e fitoalexinas isoflavonóides, ambos envolvidos nas reações de defesa das plantas (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989). A síntese de fenilpropanóides é ativada como uma resposta ao estresse que inclui a infecção por patógenos.

Lignina é o produto principal do metabolismo de fenilpropanóides e o depósito de lignina para reforçar as paredes celulares das plantas é um mecanismo de defesa induzido usado para proteção contra invasão de patógenos (LAMB et al., 1989; LIANG et al., 1989). A inibição específica de lignificação através de inibidores da enzima aumenta a susceptibilidade à doença da ferrugem causada por fungos. A indução da lignificação está diretamente correlacionada com síntese aumentada desta enzima e de enzimas adicionais envolvidas no metabolismo de

fenilpropanóides (MOERSCHBACHER et al., 1990). O mecanismo de resistência das plantas SAR induzido por patógenos ou agentes químicos possui um grande espectro de atuação no processo de defesa. As fitoalexinas, substâncias antibióticas de baixo peso molecular (PELICICE et al., 2000; SEKI et al., 1999), e as enzimas que catalisam sua síntese aparecem em baixas concentrações ou ausentes em plantas saudáveis, mas elas podem ser sintetizadas quando as plantas são expostas a certos estresses bióticos e abióticos (CHET, 1993).

As peroxidases (donor; hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) catalisam a oxidação de componentes celulares, tais como H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (KVARATSKHELIA et al., 1997). Em plantas, constituem proteção antioxidativa. A atividade de peroxidases pode aumentar em plantas submetidas a diversos tipos de estresse (ROSSI & LIMA, 2001). Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade de peroxidases e, às vezes, são as primeiras a terem atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993). A existência de múltiplas formas de peroxidase em plantas é conhecida há anos, mas a relação das isoenzimas com suas funções biológicas específicas não está clara. Contudo, aumentos na atividade de peroxidases são relatados durante a infecção de plantas superiores por patógenos. Sugere-se que as diferentes formas de peroxidases que tem sua atividade aumentada durante a infecção atuam inibindo o crescimento dos patógenos, talvez através da participação na biossíntese de compostos fenólicos (SEEVERS et al., 1971).

Os compostos fenólicos são antifúngicos, antibacterianos e antivirais reconhecidos e ocorrem em plantas. O primeiro passo do mecanismo de defesa em plantas envolve uma acumulação rápida de fenóis no local da infecção que restringe ou reduz a velocidade do crescimento dos patógenos. Além disso, as peroxidases podem oxidar fenóis para formar quinonas, mais tóxicos e que também exercem um papel integrante dentro do sistema de defesa dos vegetais (GOGOI et al., 2001). Em plantas, o aumento da produção de radicais superóxidos e de H_2O_2 é uma característica comum de respostas de defesa para desafiar os patógenos microbianos e os elicitores (BESTWICK et al., 1998; LAMB & DIXON, 1997). Aumentos na atividade de peroxidases durante as interações incompatíveis planta-patógeno são intimamente associados com uma progressiva incorporação de compostos fenólicos dentro da parede celular (FINK et al., 1991; GRAHAM & GRAHAM, 1991;

MILOSEVIC & SLUSARENKO, 1996; REIMERS et al., 1992). Tem sido proposto que um rápido aumento de H₂O₂ intra ou extracelular está envolvido na indução ou execução do mecanismo HR (LEVINE et al., 1994; LOW & MERIDA, 1996).

As polifenoloxidasas (1,2-benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.1) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) ocorrem em plantas, animais, e fungos (WHITAKER, 1994). Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando *orto*-difenois e a segunda à oxidação de *ortodifenois* formando *orto*-quinonas. As polifenoloxidasas atuam sobre uma grande variedade de substratos. Citam-se *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico como substratos monofenólicos, enquanto catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico substratos difenólicos. As polifenoloxidasas estão envolvidas no escurecimento de frutas, vegetais, cereais e leguminosas (GOMES et al., 2001). A mudança indesejável na cor, no sabor e na textura das frutas e dos vegetais é associada com as polifenoloxidasas, que são pertencentes ao grupo das oxirredutases (CLEMENTE & PASTORE, 1998).

Polifenoloxidasas são enzimas que freqüentemente aumentam sua atividade em resposta ao estresse, e um de seus principais papéis parece ser o de promover a proteção da célula (SIEGEL, 1993; SOARES et al., 2004). Participa de um variado número de reações, e por esta razão exibe um dos graus de maior versatilidade que qualquer outra enzima (TROIANI et al., 2003). Podem catalisar inúmeras reações de oxidação nas plantas (McLELLAN & ROBINSON, 1984), embora a peroxidase também esteja envolvida na oxidação enzimática (VALERO et al., 1988). A importância da atividade das polifenoloxidasas na resistência a doenças deve-se provavelmente à propriedade de oxidar compostos fenólicos em quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microorganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento.

2.5. Utilização de silicatos na indução de resistência a doenças

A nutrição de plantas determina em grande parte a sua resistência ou susceptibilidade a doenças, sua estrutura morfológica ou histológica, a função de tecidos para rápida ou lenta patogênese, a virulência e habilidade do patógeno para sobreviver. Os elementos minerais são necessários para síntese de barreiras químicas

e físicas, ou a mudança de substâncias no metabolismo ao redor do sítio de infecção. A resistência também pode ser concedida pela ausência de um nutriente essencial à atividade patogênica. Quando a demanda metabólica por determinado nutriente é maior que seu suprimento pelo meio externo, diversos mecanismos são acionados para a manutenção do equilíbrio bioquímico e fisiológico da planta. O principal método de controle das inúmeras patogenias é o químico, contudo, uma prática alternativa é manejar a nutrição mineral para aumentar a resistência à doença (MARSCHNER, 1995). Dentre os nutrientes minerais utilizados, o Silício (Si) destaca-se por reduzir a severidade de importantes doenças (EPSTEIN, 1999).

O Si é o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre. Encontra-se na solução do solo na forma monomérica ou ácido monossilícico (H_4SiO_4), prontamente absorvido pelas plantas (KORNDÖRFER, 2006). O Si é classificado por muitos autores como elemento benéfico ou útil devido aos efeitos positivos observados, como maior tolerância ao déficit hídrico, maior resistência à toxicidade de metais pesados, e maior resistência a doenças e pragas (POZZA, et al., 2004a). Resultados promissores foram encontrados em vários patossistemas, como redução da brusone, mancha parda e queima das bainhas em plantas de arroz, cercosporiose do cafeeiro, cancro da haste em plantas de soja e gomose em citrus e menor incidência de oídio em plantas de aveia, pepino, melão e uva, quando as culturas foram adubadas com Si (BOWEN et al., 1992; CARVER et al., 1998; DATNOFF et al., 1991; 1997; FAGGIANI, 2002; LIMA, 1998; MENZIES et al., 1992; POZZA et al., 2004b; RODRIGUES, 2000; SANTOS, 2002; SAMUELS et al., 1991).

O efeito do Si no controle de doenças de plantas, seu modo de ação e sua atuação na epidemia de diversos patossistemas ainda não estão totalmente esclarecidos. Existe a hipótese de formação de barreira física, fundamentada na forma do Si acumular-se nas plantas. Em seu movimento ascendente via apoplasto desde as raízes até as folhas, o Si polimeriza-se nos espaços extracelulares, acumulando-se nas paredes das células epidérmicas das folhas e dos vasos do xilema (FAWE et al., 2001). Contudo, a alteração da nutrição da planta promovida pela suplementação silicatada e a observação de aumento na atividade de enzimas e presença de fitoalexinas levantaram também a hipótese de seu envolvimento na indução das reações de defesa da planta (BÉLANGER et al., 2003; BÉLANGER & MENZIES, 2003; POZZA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003). Os estudos de Si no controle de doenças tiveram início com monocotiledôneas, pois estas absorvem

grandes quantidades deste nutriente, porém o interesse pelo estudo em patossistemas envolvendo dicotiledôneas surgiu na segunda metade do século passado, centralizando-se principalmente nos estudos com oídios.

O Si é absorvido pelas plantas como ácido monossilícico, porém seu teor é variável entre as espécies. São classificadas como plantas acumuladoras de Si aquelas cujos teores são superiores a 1% na matéria seca e não-acumuladoras plantas com menos de 0,5% (MARSCHNER, 1995). Como exemplos de plantas acumuladoras têm-se as gramíneas como arroz, cana-de-açúcar, trigo e cevada, já as plantas não-acumuladoras podem ser exemplificadas pelo tomate, batata e café. Ainda existem as plantas intermediárias na absorção de Si cujos teores variam entre 0,5 a 1% na matéria seca, sendo que a soja, morango e pepino exemplificam esta classe (MA et al., 2001). A diferença no acúmulo de Si entre as espécies de plantas, é resultado da diferença na habilidade de absorver silício, e desta maneira as plantas também são classificadas quanto à absorção em: as que apresentam absorção ativa, mais rápido que a absorção da água, passiva, similar a do fluxo da água, e as que rejeitam, absorvendo mais lentamente que a absorção de água (MA & TAKAHASHI, 2002; TAKAHASHI et al., 1990).

As principais fontes de Si utilizadas são as escórias siderúrgicas (silicato de cálcio - CaSiO_3), resíduos provenientes da metalurgia do ferro no Brasil e Japão obtido de usinas de aço e da fabricação de fosfato tricálcico nos Estados Unidos (GASCHO, 2001). Trabalhos recentes apontam como uma excelente fonte de Si, auxiliando na correção do pH do solo e promovendo o incremento de acúmulo de Si em espécies como o capim braquiária (PRADO et al., 2007), aumentando a concentração de Si disponível no solo (FONSECA et al., 2007), redução na concentração de Al trocável no perfil do solo e aumento na produção de cana-de-açúcar (NOLLA & KORNDÖRFER, 2007) e ainda maior disponibilidade de P no solo e aumento da produção de tubérculos de batata (CRUSCIOL et al., 2007). Como fontes de silício existem ainda: silicato de magnésio (MgSiO_3), proveniente de siderurgia, embora com baixa solubilidade (GASCHO, 2001); wollastonita, como silicato de cálcio puro, a qual é amplamente empregada na pesquisa (RODRIGUES, 2000); o silicato de sódio (Na_2SiO_3) como fonte para aplicação via foliar e solo; e o silicato de potássio (K_2SiO_3) utilizado em solução nutritiva e via foliar, principalmente visando o controle de doenças (KANTO et al., 2004; LIANG, et al., 2005; MENZIES et al., 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ensaios em casa de vegetação

3.1.1. Cultura do cafeeiro

Mudas de cafeeiro da variedade Catuaí Vermelho 44 com 3 pares de folhas abertos, altamente susceptível à ferrugem, provenientes do banco de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG, foram dispostas em bandejas num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4. Um total de 90 mudas de cafeeiro foram utilizadas por cada tratamento. Os fatores estudados foram: inoculação ou não inoculação da face inferior das folhas das mudas de café com *H. vastatrix* e aplicação dos seguintes tratamentos: 1- pulverização com água destilada (controle); 2- pulverização com silicato de potássio na dose de 35 g/L e pH 10,2; 3- pulverização com silicato de potássio na dose de 35 g/L e pH 5,5 (correção do pH feita com solução de H₃PO₄ 5 M); 4- pulverização com Acibenzolar-S-Metil (ASM) (padrão de indução de resistência) na dose de 200 µg/L.

Pulverizou-se o 2º e o 3º par de folhas de cada muda de cafeeiro com cada um dos tratamentos listados acima utilizando um atomizador Paasche (modelo VL-SET) alimentado por sucção, considerando-se o primeiro par de folhas abaixo da gema apical. Vinte quatro horas após a aplicação dos tratamentos, foi realizada a inoculação da face abaxial dos dois pares de folhas (2º e 3º) de cada muda, com uma suspensão de uredósporos de *H. vastatrix* de concentração 1 mg/mL, com auxílio de um atomizador Paasche (modelo VL-SET) alimentado por sucção.

O inóculo foi obtido a partir de plantas de cafeeiro (cv. Catuaí vermelho 44) com sinais de ferrugem causados pela raça II de *H. vastatrix*. Recolheram-se os uredósporos com o auxílio de um pincel de cerdas macias, raspando-se suavemente as pústulas da superfície abaxial das folhas. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara úmida (UR > 95%, 23-25°C), onde permaneceram no escuro por 48 h. Após esse período, as mudas foram levadas para câmara de crescimento a 22°C, onde permaneceram durante a condução dos experimentos.

Avaliou-se o número de pústulas por folha de cada muda e a severidade final da ferrugem aos 36 dias após inoculação das mudas. Um total de 55 folhas por tratamento foi utilizado para avaliação desses dois componentes de resistência. A

severidade da ferrugem foi avaliada seguindo uma escala desenvolvida por KUSHALAPPA & CHAVES (1978).

Folhas de mudas de cafeeiro de cada tratamento e repetição foram coletadas ao final do experimento para determinação do teor foliar de Si e de K. As folhas foram lavadas com água de torneira, seguida por água deionizada e uma solução de HCl 0,1 M, finalizando o enxágüe com água deionizada. Em seguida, as folhas foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 60°C por 72 h, sendo então trituradas em moinho tipo Wiley equipado com peneira de 20 mesh. A metodologia proposta por KORNDÖRFER et al. (2004) foi utilizada para determinação do teor foliar de Si. A determinação do teor foliar de K foi realizada por digestão nitroperclórica e espectrofotometria de absorção atômica (SILVA et al., 1999).

3.1.2. Cultura da soja

Um total de 8 sementes de soja da variedade Conquista, altamente susceptível à ferrugem asiática, provenientes do banco de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG, foram plantadas em vasos com capacidade para 2 Kg. Após a germinação, efetuou-se o desbaste, deixando-se 4 plantas por vaso. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 com 5 repetições. Os fatores estudados foram: inoculação ou não inoculação da face inferior das folhas das plantas de soja com *P. pachyrhizi* e aplicação dos seguintes tratamentos: 1- pulverização com água destilada (controle); 2- pulverização com silicato de potássio na dose de 40 g/L e pH 10,2; 3- pulverização com silicato de potássio na dose de 40 g/L e pH 5,5 (correção do pH feita com solução de HCl 6 M); 4- pulverização com Acibenzolar-S-Metil (ASM) (padrão de indução de resistência) na dose de 0,625 g/L.

A face inferior das folhas de cada planta de soja (estádio V6) foi pulverizada com cada um dos tratamentos listados acima utilizando um atomizador Paasche (modelo VL-SET) alimentado por sucção 24 h antes da inoculação com *P. pachyrhizi*. Após esse período, as plantas foram inoculadas com a suspensão de uredósporos com o auxílio de um atomizador Paasche (modelo VL-SET) alimentado por sucção. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara úmida (UR > 95%, 23-25°C), onde permaneceram no escuro por 24 h. Após esse período, as

plantas foram levadas para casa de vegetação (UR \approx 75%, $22 \pm 2^\circ\text{C}$), onde permaneceram durante a condução dos experimentos.

Para produção de inóculo, as plantas de soja foram inoculadas com *P. pachyrhizi* e mantidas em casa de vegetação. O inóculo utilizado no experimento foi obtido mergulhando-se as folhas de soja com sinais de ferrugem em solução de gelatina 5g/L e Tween 80 a 0,01 %, em água destilada e esterilizada. As folhas foram raspadas com pincel pêlo de camelo número 4 para remover o uredósporos. Após raspagem, a suspensão de uredósporos foi filtrada em gaze e a concentração do inóculo de *P. pachyrhizi* foi ajustada para $10^5/\text{mL}$.

Avaliou-se a severidade da ferrugem asiática aos 16 dias após inoculação das plantas de soja utilizando-se 1 folha (3 folíolos) por planta. A severidade da ferrugem asiática foi avaliada utilizando uma escala proposta por GODOY et al. (2006). Os dados de severidade em cada folha da planta por tratamento e repetição foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Folhas de plantas de soja de cada tratamento e repetição foram coletadas ao final do experimento para determinação do teor foliar de Si e de K. As folhas foram lavadas com água de torneira, seguida por água deionizada e uma solução de HCl 0,1 M, finalizando o enxágüe com água deionizada. Em seguida, as folhas foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 60°C por 72 h, sendo então trituradas em moinho tipo Wiley equipado com peneira de 20 mesh. A metodologia proposta por KORNDÖRFER et al. (2004) foi utilizada para determinação do teor foliar de Si. A determinação do teor foliar de K foi realizada por digestão nitroperclórica e espectrofotometria de absorção atômica (SILVA et al., 1999).

3.2. Ensaio bioquímicos

3.2.1. Cultura do cafeeiro

Para determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa do cafeeiro à ferrugem, coletaram-se folhas de mudas de café aos 1, 2, 4, 14 e 36 dias após a inoculação com *H. vastatrix*. Folhas de mudas de cafeeiro não inoculadas também foram coletadas nessas mesmas datas. Cada amostra coletada foi composta por 3 folhas retiradas de cada muda para cada enzima por tratamento, perfazendo um

total de 3 amostras, sendo que 3 mudas (repetições) foram envolvidas para cada amostra coletada. As amostras foram armazenadas individualmente em pacotes de papel alumínio e imediatamente congeladas em N₂ líquido, sendo, em seguida, armazenadas em freezer -80°C para posterior análise. De cada extrato foliar obtido procederam-se aos ensaios enzimáticos em triplicata. As médias dos valores da atividade de cada enzima em cada época de coleta, dentro de cada tratamento, entre as plantas inoculadas e não inoculadas foram comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.2. Cultura da soja

Para determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa da soja à ferrugem asiática, coletaram-se folhas das plantas de soja às 24, 36, 48, 168 e 384 h após a inoculação com *P. pachyrhizi*. Folhas de plantas de soja não inoculadas também foram coletadas nessas mesmas épocas. Cada amostra coletada foi composta por 3 folíolos (1 folha) retirados de cada planta para cada enzima por tratamento, perfazendo um total de 3 amostras, sendo que 3 plantas (repetições) foram envolvidas para cada amostra coletada. As amostras foram armazenadas individualmente em pacotes de papel alumínio e imediatamente congeladas em N₂ líquido, sendo, em seguida, armazenadas em freezer -80°C para posterior análise. De cada extrato foliar obtido procederam-se aos ensaios enzimáticos em triplicata. As médias dos valores da atividade de cada enzima em cada época de coleta, dentro de cada tratamento, entre as plantas inoculadas e não inoculadas foram comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

3.3. Determinação da atividade enzimática em plantas de café e soja

3.3.1. β -1,3-glucanases (GLU)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por LANNA et al. (1996). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração que foi adicionado, e

fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM, cuja quantidade foi calculada com base no volume final da extração. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 na proporção de 1:3 (p/v), isto é, a cada 1 g de material vegetal foram adicionados 3 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 20.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 25 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de β -1,3-glucanases nas amostras foi determinada conforme método descrito por LEVER (1972), com modificações: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em substituição à hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (MILLER, 1956). A mistura de reação, que foi incubada a 45°C por 30 minutos, continha 230 μ L do tampão de reação acetato de sódio 100 mM pH 5,0, 250 μ L da solução de substrato laminarina 4 mg/mL e 20 μ L do extrato vegetal. Após esse período, foram acrescentados 1 mL de DNS, e em seguida esta mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento em gelo até temperatura de 30°C, as amostras tiveram a absorbância determinada no comprimento de onda 540 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. Subtraiu-se o valor de absorbância de cada amostra do valor de absorbância do controle (uma mistura idêntica à da amostra, com a reação paralisada no início). Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

3.3.2. Quitinases (QUI)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por LANNA et al. (1996). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração que foi adicionado, e

fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM, cuja quantidade foi calculada com base no volume final da extração. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 na proporção de 1:3 (p/v), isto é, a cada 1 g de material vegetal foram adicionados 3 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 20.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 25 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de quitinases nas amostras foi determinada conforme método descrito por HARMAN et al. (1993) e ROBERTS & SELITRENNIKOFF (1988). A mistura de reação, que foi incubada a 37°C por 2 horas, continha 470 µL do tampão de reação acetato de sódio 50 mM pH 5,0, 10 µL da solução de substrato *p*-nitrofenil-β-D-*N,N'*-diacetilquitobiose (PNP) 2 mg/mL e 20 µL do extrato vegetal. Após esse período, foram acrescentados 0,5 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,2 M. Posteriormente, as amostras tiveram a absorvância determinada no comprimento de onda 410 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. Subtraiu-se o valor de absorvância de cada amostra do valor de absorvância do controle (uma mistura idêntica à da amostra, com a reação paralisada no início). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

3.3.3. Lipoxigenases (LOX)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por PEIXOTO (1998). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração que foi adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM e ácido etilenodiamino tetra-acético

(EDTA) 0,1 mM, na proporção de 1:3 (p/v), isto é, a cada 3 g de material vegetal foram adicionados 9 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 20 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de lipoxigenases nas amostras foi determinada conforme método descrito por AXELROD et al. (1981). A mistura de reação que continha 2.000 µL do tampão de reação fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e 30 µL da solução de substrato linoleato de sódio 10 mM foi levada ao banho-maria à temperatura de 25°C para estabilização por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 30 µL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 234 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 3 minutos em intervalos de 30 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 25.000 M⁻¹.cm⁻¹ (AXELROD et al., 1981). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em M.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

3.3.4. Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por CAHILL & McCOMB (1992). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração borato de sódio 0,1 M pH 8,8 contendo polivinilpirrolidona (PVP) 5% (p/v) e β-mercaptoetanol 20 mM, na proporção de 1:100 (p/v), isto é, a cada 0,1 g de material vegetal foram adicionados 10 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições

necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 10 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de fenilalanina amônia-liase nas amostras foi determinada conforme método descrito por CAHILL & McCOMB (1992). A mistura de reação que continha 1.000 µL do tampão de reação borato de sódio 0,2 M pH 8,8 e 1.000 µL da solução de substrato L-fenilalanina 0,1 M foi levada ao banho-maria à temperatura de 30°C para estabilização por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 1000 µL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 290 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 5 minutos em intervalos de 60 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em $\text{M} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg}$ de proteína (atividade específica).

3.3.5. Peroxidases (POD)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por PEIXOTO (1998). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração que foi adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM, na proporção de 1:10 (p/v), isto é, a cada 0,3 g de material vegetal foram adicionados 3 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 15 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à

4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de peroxidases nas amostras foi determinada conforme método descrito por KAR & MISHRA (1976). A mistura de reação que continha 950 µL de água destilada, 750 µL do tampão de reação fosfato de potássio 100 mM pH 6,8, 600 µL da solução de substrato pirogalol 100 mM e 600 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM foi levada ao banho-maria à temperatura de 25°C para estabilização por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 100 µL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 420 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 5 minutos em intervalos de 60 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹.cm⁻¹ (CHANCE & MAEHLEY, 1955). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em M.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

3.3.6. Polifenoloxidasas (PPO)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por PEIXOTO (1998). Amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração que foi adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM, na proporção de 1:3 (p/v), isto é, a cada 1 g de material vegetal foram adicionados 3 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze, dobrado em quatro camadas, umedecida com água e foi feita a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 15 minutos. O sobrenadante após a centrifugação é o extrato bruto e foi armazenado à 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi

utilizada para determinação da concentração de proteínas seguindo o procedimento desenvolvido por WARBURG & CHRISTIAN (1941).

A atividade de polifenoloxidasas nas amostras foi determinada conforme método descrito por KAR & MISHRA (1976). A mistura de reação que continha 1550 μL de água destilada, 750 μL do tampão de reação fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 e 600 μL da solução de substrato pirogalol 100 mM foi levada ao banho-maria à temperatura de 25°C para estabilização por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 100 μL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 420 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 5 minutos em intervalos de 60 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 2,47 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (CHANCE & MAEHLEY, 1955). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em $\text{M}.\text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteína (atividade específica).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento com Cafeeiro

4.1.1. Severidade da ferrugem

A maior severidade da ferrugem e o maior número de pústulas por folha ocorreu no tratamento 1 (Figura 1). Nos tratamentos 2, 3 e 4 essas variáveis foram reduzidas, principalmente no tratamento 4, onde observou-se uma redução de 63 e 69%, respectivamente, na severidade da ferrugem e número de pústulas por folha em comparação ao tratamento 1, indicando o potencial do Acibenzolar-S-Metil como indutor de resistência. Ao comparar o tratamento 2 com o tratamento 1, observou-se uma redução de 24 e 25%, respectivamente, nas variáveis A e B, enquanto houve uma redução de 53 e 50% quando comparou-se o tratamento 3 em relação ao tratamento 1. Estes resultados foram coerentes com a sintomatologia da ferrugem em folhas de cafeeiro que receberam a aplicação dos diferentes tratamentos (Figura 2).

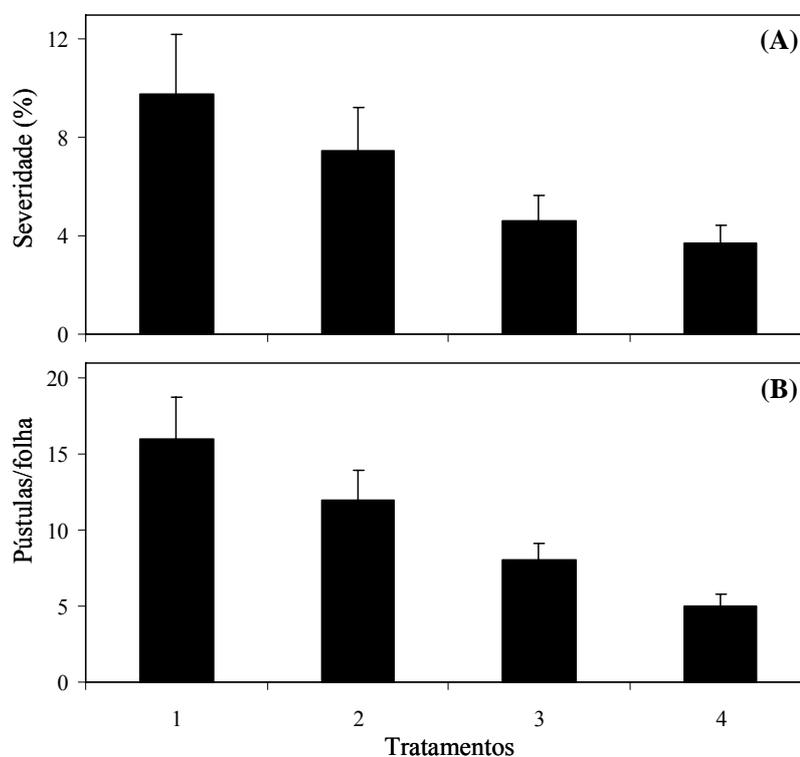


Figura 1. Severidade da ferrugem do cafeeiro (A) e número de pústulas por folha (B) aos 36 dias após inoculação das plantas que receberam os seguintes tratamentos: 1- controle (água); 2- silicato de potássio (pH 10,2); 3- silicato de potássio (pH 5,5) e 4- Acibenzolar-S-Metil.

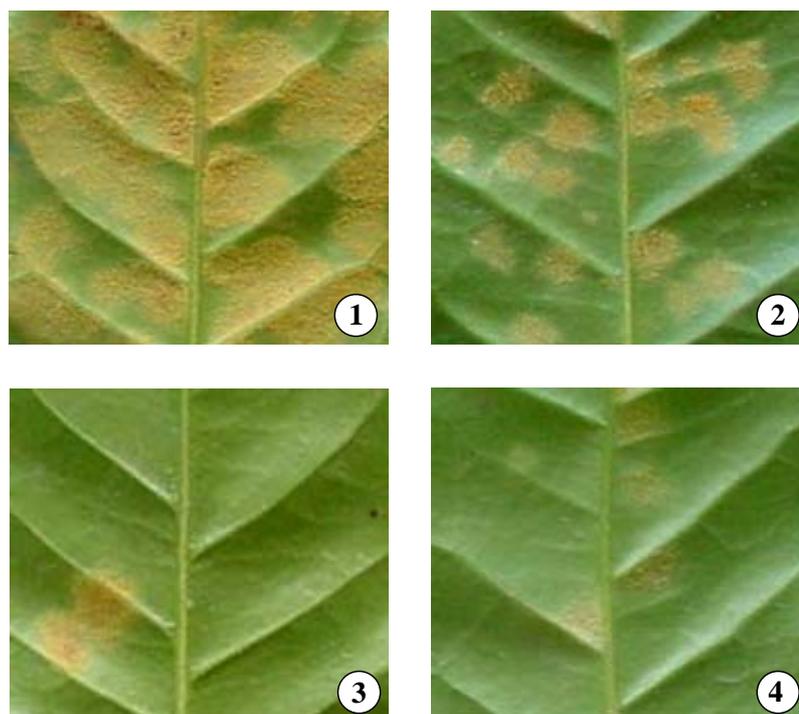


Figura 2. Sintomatologia da ferrugem na face inferior das folhas de cafeeiro que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4).

4.1.2. Teores foliares de silício e potássio

Observa-se que, independente dos tratamentos utilizados e da inoculação ou não inoculação das plantas, não houve variação nos teores foliares de Si e de K (Tabela 1). A redução da severidade e do número de pústulas por folha deve ser atribuída ao silicato aplicado, uma vez que as folhas foram lavadas antes das análises, retirando todo o silício polimerizado presente sobre a superfície da folha. A diferença observada entre os dois tratamentos com silicato de potássio na redução da doença foi notável no tratamento 3 (Figura 2).

Tabela 1. Teores foliares de Si e K em PNI e PI com *Hemileia vastatrix*.

Tratamentos	Si (%)		K (%)	
	PNI	PI	PNI	PI
controle (água)	0,39	0,51	2,70	2,64
silicato de potássio (pH 10,2)	0,37	0,42	2,93	2,59
silicato de potássio (pH 5,5)	0,33	0,48	2,62	2,74
Acibenzolar-S-Metil	0,41	0,44	2,67	2,77

PNI = plantas não inoculadas; PI= plantas inoculadas.

4.1.3. Atividade enzimática

4.1.3.1. β -1,3-glucanases (GLU)

Observa-se que a atividade de GLU em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) diminuiu de 1 a 4 dias após inoculação e aumentou a partir do 4º dia, atingindo um pico aos 36 dias (Figura 3). Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos 14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade da enzima diminuiu no período de 1 a 2 dias e aumentou a partir do 2º dia com tendência a se manter constante após os 36 dias.

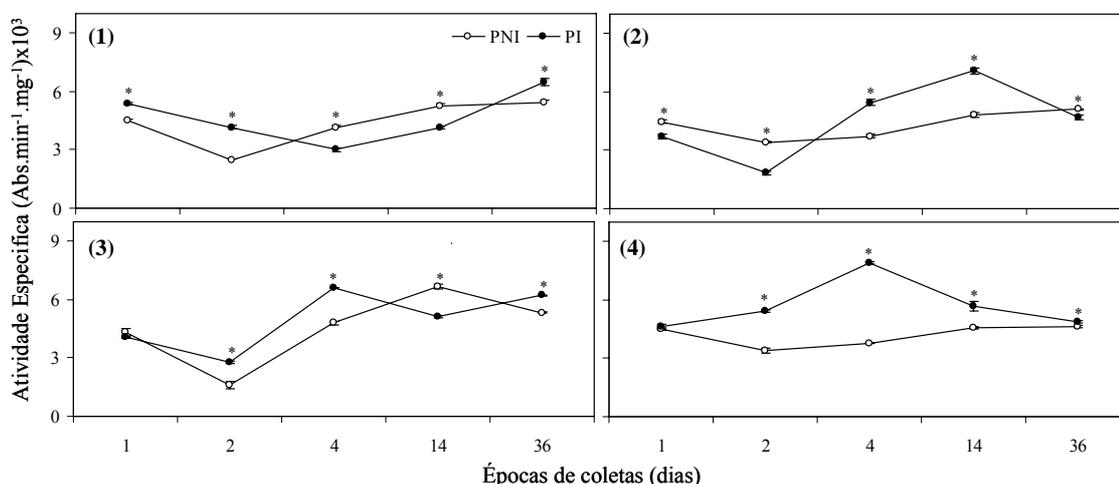


Figura 3. Curvas de progresso da atividade enzimática de GLU em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de GLU diminuiu no período de 1 a 2 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 3). Nas folhas de plantas inoculadas, a atividade da enzima foi maior do que em folhas de plantas não inoculadas de 4 a 14 dias após inoculação, porém níveis similares de atividade ocorreram aos 36 dias.

Observou-se uma oscilação na atividade de GLU no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 (Figura 3). Houve um

decréscimo da atividade enzimática no período de 1 a 2 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Nas folhas de plantas inoculadas, a atividade da enzima foi maior do que em folhas de plantas não inoculadas de 2 a 4 dias após inoculação, com tendência a se manter crescente após os 14 dias.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de GLU em folhas de plantas inoculadas foi maior que em folhas de plantas não inoculadas em quase todas as épocas de coletas, atingindo um pico aos 4 dias após inoculação com o patógeno (Figura 3). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima permaneceu constante no decorrer do tempo.

4.1.3.2. Quitinases (QUI)

Observa-se que a atividade de QUI em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) diminuiu de 1 a 14 dias após inoculação e aumentou a partir do 14º dia, atingindo um pico aos 36 dias (Figura 4). Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos 14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade da enzima manteve-se com tendência constante no decorrer das épocas de coletas.

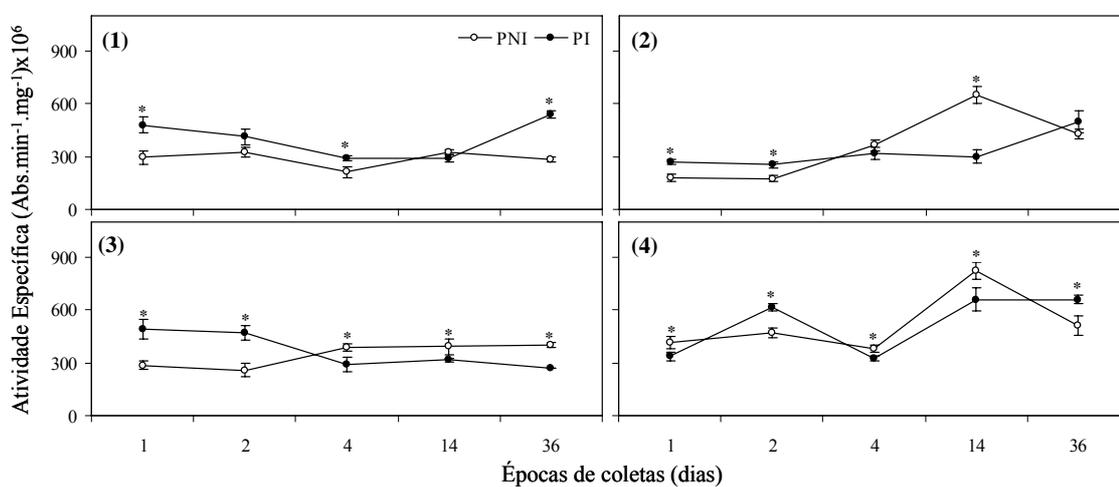


Figura 4. Curvas de progresso da atividade enzimática de QUI em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de QUI permaneceu constante no período de 1 a 4 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 4). Nas folhas de plantas inoculadas, a atividade da enzima manteve-se com constante até o 14º dia, mantendo tendência crescente após os 14 dias. Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade foi maior do que em plantas inoculadas de 4 a 14 dias, porém níveis similares de atividade ocorreram aos 36 dias.

Observou-se no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 que a atividade de QUI em folhas de plantas inoculadas foi maior que em plantas não inoculadas de 1 a 2 dias após inoculação (Figura 4). No período de 2 a 4 dias a atividade em folhas de plantas inoculadas decresce, permanecendo constante no decorrer das coletas, enquanto a atividade das plantas não inoculadas aumenta, permanecendo constante ao longo do tempo.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de QUI em folhas de plantas inoculadas foi oscilante no período de 1 a 14 dias, mantendo-se com tendência constante após o 14º dia (Figura 4). Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade enzimática permaneceu constante de 1 a 4 dias e em seguida aumentou até o 14º dia, atingindo um pico, mantendo-se com tendência decrescente aos 36 dias.

4.1.3.3. Lipoxigenases (LOX)

Observa-se que a atividade de LOX em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) diminuiu de 1 a 4 dias após inoculação e aumentou a partir do 4º dia, com tendência a se manter constante aos 36 dias (Figura 5). Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos 14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas o perfil foi similar ao das plantas inoculadas, exceto que após o 14º dia houve decréscimo da atividade.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de LOX decresceu no período de 1 a 4 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno, sendo a atividade da enzima maior nas plantas não inoculadas do que nas plantas inoculadas (Figura 5). Nas folhas de plantas inoculadas, a atividade da enzima foi maior que nas plantas não inoculadas a partir do 4º dia, porém níveis similares ocorreram aos 36 dias.

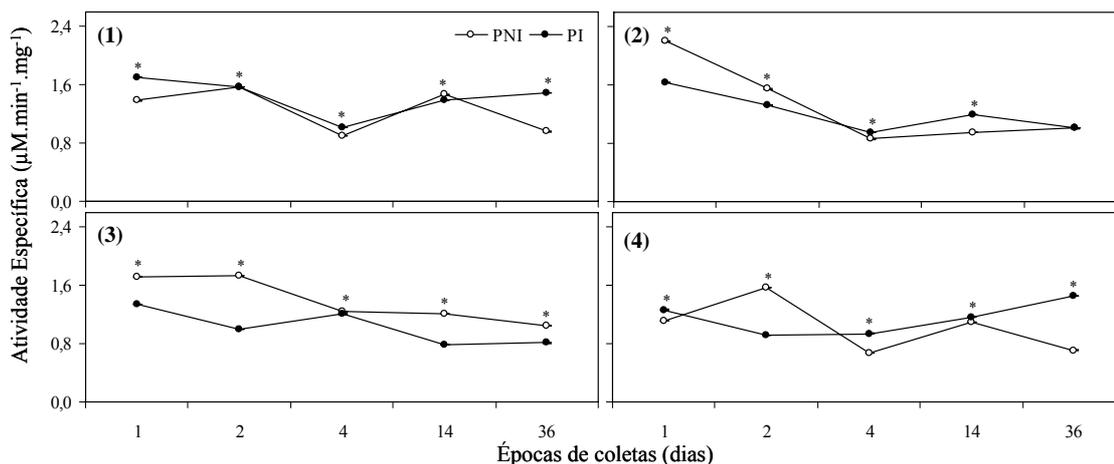


Figura 5. Curvas de progresso da atividade enzimática de LOX em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Observou-se no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 que a atividade de LOX em folhas de plantas inoculadas foi menor que em plantas não inoculadas durante todas as épocas de coletas, sendo similares aos 4 dias após inoculação (Figura 5). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade oscilou, permanecendo constante após o 14° dia, enquanto nas folhas de plantas não inoculadas a atividade foi constante de 1 a 2 dias, decrescendo ao longo do tempo.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de LOX em folhas de plantas não inoculadas foi oscilante durante todas as épocas de coletas, atingindo um pico aos 2 dias e mantendo-se com tendência decrescente após o 14° dia (Figura 5). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade enzimática diminuiu de 1 a 2 dias após inoculação e em seguida manteve-se com tendência crescente até os 36 dias.

4.1.3.4. Fenilalanina amônia-liase (PAL)

Observa-se que a atividade de PAL em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) diminuiu de 1 a 2 dias após inoculação e aumentou a partir do 2° dia, com tendência a se manter constante após os 14 dias (Figura 6). Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos

14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade manteve-se constante durante todas as épocas de coletas.

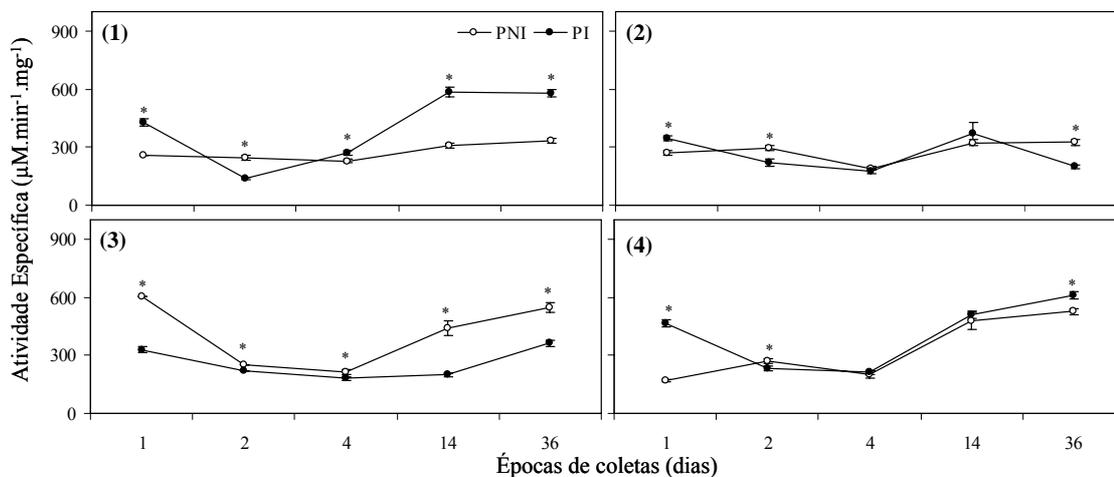


Figura 6. Curvas de progresso da atividade enzimática de PAL em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de PAL decresceu no período de 1 a 4 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 6). Nas folhas de plantas inoculadas, a atividade da enzima aumentou até o 14º dia, atingindo um pico similarmente às plantas não inoculadas, porém após os 14 dias a atividade manteve-se com tendência constante nas plantas não inoculadas, enquanto decresceu nas inoculadas aos 36 dias.

Observou-se no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 que a atividade de PAL em folhas de plantas inoculadas foi menor que em plantas não inoculadas durante todas as épocas de coletas, sendo similares apenas de 2 a 4 dias após inoculação (Figura 6). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade foi constante até os 14 dias, apresentando tendência crescente após o 14º dia, enquanto nas plantas não inoculadas a atividade foi decrescente de 1 a 2 dias e seguiu aumentando ao longo do tempo.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de PAL em folhas de plantas não inoculadas manteve-se com tendência crescente durante todas as épocas de coletas até os 36 dias, similarmente ao perfil das

plantas inoculadas a partir do 2º dia (Figura 6). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade enzimática diminuiu de 1 a 2 dias após inoculação.

4.1.3.5. Peroxidases (POD)

Observa-se que a atividade de POD em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) aumentou de 1 a 2 dias após inoculação e diminuiu a partir do 2º dia, com tendência a se manter crescente após os 4 dias (Figura 7). Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos 14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade decresceu de 1 a 4 dias e em seguida aumentou até os 36 dias, sendo que a atividade destas foi maior que a atividade das plantas inoculadas durante todas as épocas de coletas.

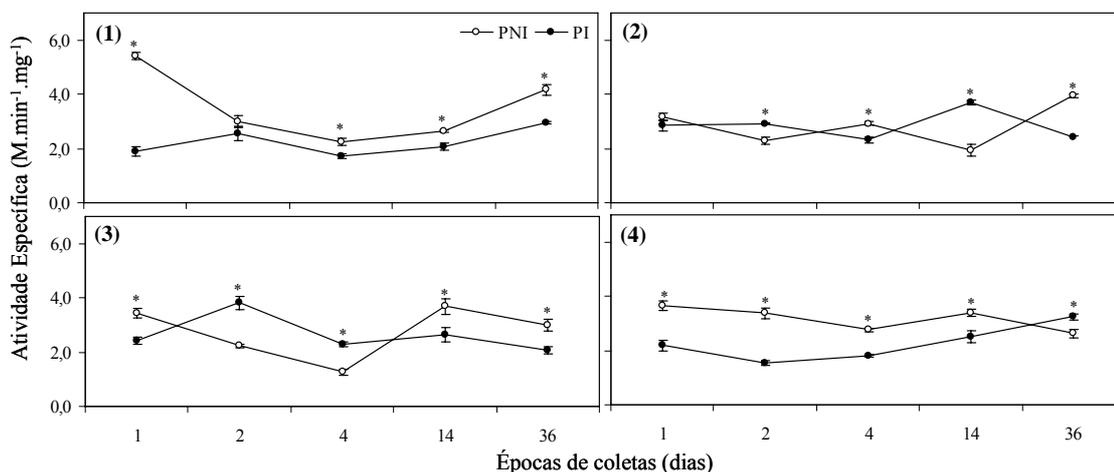


Figura 7. Curvas de progresso da atividade enzimática de POD em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de POD decresceu no período de 1 a 4 dias em folhas de plantas inoculadas e em seguida aumentou até o 14º dia, atingindo um pico com tendência decrescente aos 36 dias (Figura 7). Nas folhas das plantas não inoculadas a atividade foi oscilante durante todas as épocas de coletas, com tendência crescente após os 14 dias.

Observou-se no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 que a atividade de POD em folhas de plantas inoculadas foi oscilante no decorrer do tempo, onde aumentou de 1 a 2 dias após inoculação, atingindo um pico e manteve-se decrescente após o 14º dia (Figura 7). Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade decresceu de 1 a 4 dias, manteve tendência crescente após o 4º dia, alcançando um pico aos 14 dias e em seguida decresceu aos 36 dias.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de POD diminuiu de 1 a 2 dias em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 7). Nas folhas das plantas inoculadas a atividade manteve-se com tendência crescente a partir do 2º dia até os 36 dias. Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade enzimática oscilou ligeiramente a partir do 2º dia, decrescendo após os 14 dias.

4.1.3.6. Polifenoloxidasas (PPO)

Observa-se que a atividade de PPO aumentou de 1 a 2 dias após inoculação e diminuiu a partir do 2º dia em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) (Figura 8). Em folhas de plantas inoculadas a atividade cresceu a partir do 14º dia. Este aumento coincidiu com o aparecimento das pústulas nas folhas aos 14 dias aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade manteve-se crescente a partir do 4º dia, sendo que a atividade destas foi maior que a atividade das plantas inoculadas durante quase todas as épocas de coletas.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de PPO oscilou ligeiramente ao longo do tempo em folhas de plantas inoculadas, porém aumentou mais abruptamente de 1 a 2 dias, atingindo um pico e mantendo tendência constante após os 14 dias (Figura 8). Nas folhas das plantas não inoculadas a atividade foi crescente de 1 a 4 dias, com tendência constante após o 4º dia durante as épocas de coletas até os 36 dias.

Observou-se no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 que a atividade de PPO foi crescente de 1 a 2 dias após inoculação em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 8). Nas folhas das plantas inoculadas a atividade diminuiu até o 4º dia e manteve-se crescente no

decorrer do tempo, até os 36 dias. Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade manteve tendência constante após o 2º dia durante todas as épocas de coletas.

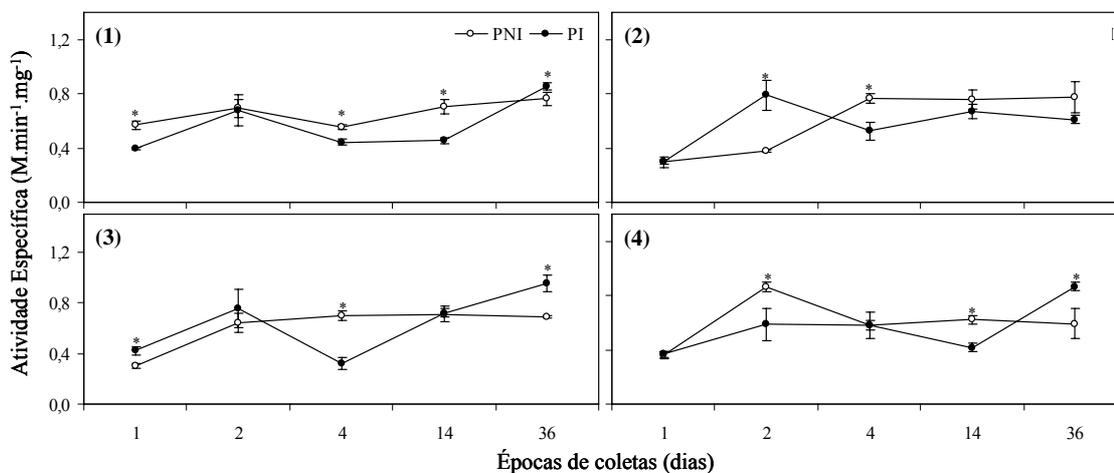


Figura 8. Curvas do progresso da atividade enzimática de PPO em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de PPO aumentou de 1 a 2 dias em folhas de plantas inoculadas ou não inoculadas com o patógeno (Figura 8). Nas folhas das plantas inoculadas a atividade manteve-se constante até os 4 dias após inoculação, apresentando tendência crescente a partir do 14º dia. Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade enzimática decresceu até o 4º dia, mantendo-se constante até os 36 dias.

4.2. Experimento com Soja

4.2.1. Severidade da ferrugem asiática

Os menores valores de severidade da ferrugem ocorreram nos tratamentos 3 e 4, os quais foram significativamente diferentes dos tratamentos 1 e 2 (Figura 9). Houve uma redução de 44 e 77%, respectivamente, na severidade da ferrugem dos tratamentos 3 e 4 em comparação ao tratamento 1 (controle). O silicato de potássio no pH 5,5 mostrou-se com eficiência semelhante ao padrão de indução de resistência comercial Acibenzolar-S-Metil em reduzir a severidade da ferrugem asiática da soja.

Ao comparar o tratamento 2 com o tratamento 1 observou-se uma redução de apenas 14% na severidade da ferrugem. Estes resultados foram coerentes com a sintomatologia da ferrugem asiática em folhas de soja que receberam a aplicação dos diferentes tratamentos (Figura 10).

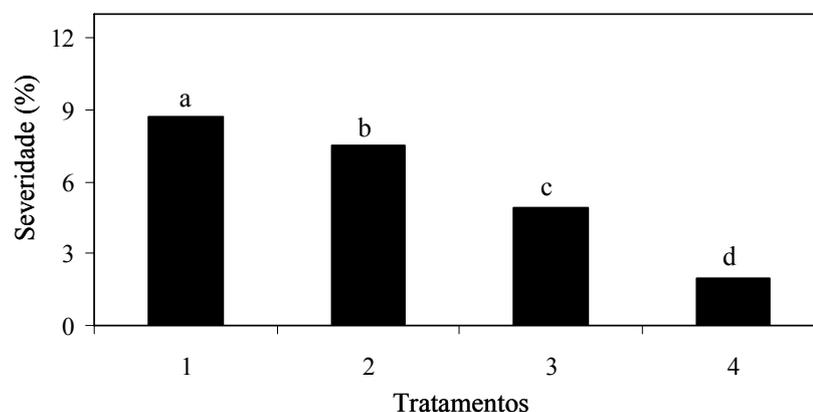


Figura 9. Severidade da ferrugem asiática da soja aos 21 dias após inoculação das plantas que receberam os seguintes tratamentos: 1- controle (água); 2- silicato de potássio (pH 10,2); 3- silicato de potássio (pH 5,5) e 4- Acibenzolar-S-Metil. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

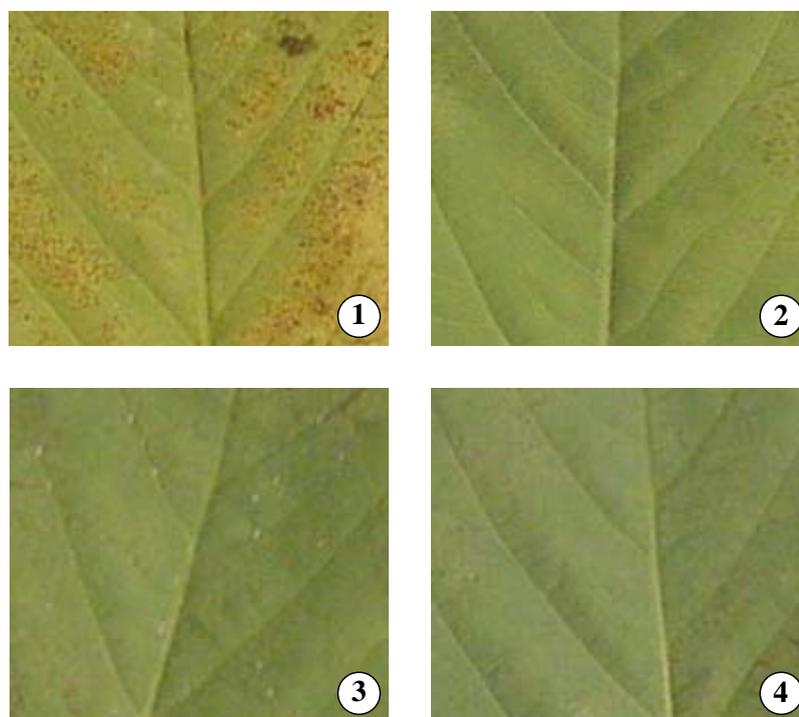


Figura 10. Sintomatologia da ferrugem asiática na face inferior das folhas de soja que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4).

4.2.2. Teores foliares de silício e potássio

Observa-se que, independente dos tratamentos utilizados e da inoculação ou não inoculação das plantas, não houve variação nos teores foliares de Si e de K (Tabela 2). A redução da severidade deve ser atribuída ao silicato aplicado, uma vez que as folhas foram lavadas antes das análises, retirando todo o silício polimerizado sobre a superfície da folha. A diferença observada entre os dois tratamentos com silicato de potássio na redução da doença foi notável no tratamento 3 (Figura 10).

Tabela 2. Teores foliares de Si e K em PNI e PI com *Phakopsora pachyrhizi*.

Tratamentos	Si (%)		K (%)	
	PNI	PI	PNI	PI
controle (água)	1,38	1,51	1,13	0,99
silicato de potássio (pH 10,2)	1,25	1,54	1,33	1,06
silicato de potássio (pH 5,5)	1,29	1,57	1,29	1,14
Acibenzolar-S-Metil	1,32	1,61	1,33	1,10

PNI = plantas não inoculadas; PI= plantas inoculadas.

4.2.3. Atividade enzimática

4.2.3.1. β -1,3-glucanases (GLU)

Observou-se que a atividade de GLU em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) diminuiu de 24 a 36 horas após inoculação e aumentou a partir da 36^a hora atingindo um pico às 168 horas (Figura 11). Este aumento coincidiu com o aparecimento dos sintomas da ferrugem nas folhas às 168 horas aproximadamente. Em folhas de plantas não inoculadas a atividade da enzima foi oscilante durante todo o tempo, sendo que na maior parte das épocas de coletas ela foi menor que a atividade nas plantas inoculadas.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de GLU aumentou no período de 24 a 48 horas em folhas de plantas inoculadas e em seguida oscilou até as 384 horas, com tendência crescente (Figura 11). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima diminuiu de 24 a 48 horas, e seguiu perfil oscilante até as 384 horas, com tendência

decrecente. As plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno tiveram níveis similares de atividade às 168 horas.

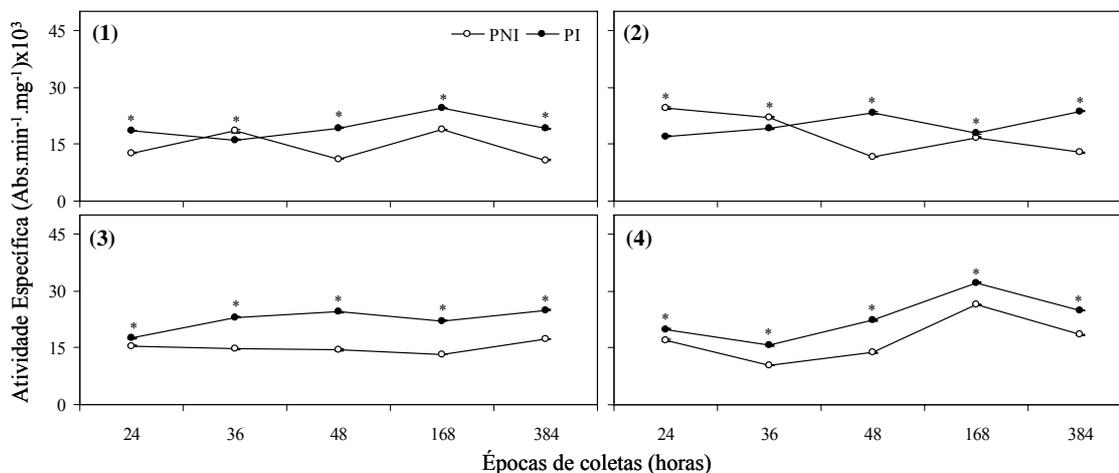


Figura 11. Curvas de progresso da atividade enzimática de GLU em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Observou-se uma similaridade nos perfis de atividade de GLU no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno, diferenciando nos níveis de atividade mais elevados nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas (Figura 11). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade da enzima apresentou tendência crescente ao longo do tempo, enquanto nas folhas de plantas não inoculadas mostrou-se constante até as 168 horas, onde passou a aumentar.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de GLU em folhas de plantas inoculadas foi significativamente maior que em folhas de plantas de soja não inoculadas em todas as épocas de coletas, atingindo um pico de atividade máxima às 168 horas após inoculação com o patógeno (Figura 11). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima seguiu perfil similar ao das plantas inoculadas ao longo do tempo, porém com níveis significativamente mais baixos que nas plantas inoculadas, o que mostrou o potencial do ASM em induzir resistência.

4.2.3.2. Quitinases (QUI)

Observou-se que a atividade de QUI em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno e que receberam a aplicação de água (controle) seguiram perfis enzimáticos similares durante todas as épocas de coletas (Figura 12). A atividade diminuiu de 24 a 36 horas após inoculação e aumentou a partir da 36ª hora atingindo um pico às 168 horas. Este aumento coincidiu com o aparecimento dos sintomas da ferrugem nas folhas inoculadas às 168 horas aproximadamente. Em seguida houve um decréscimo na atividade da enzima até as 384 horas.

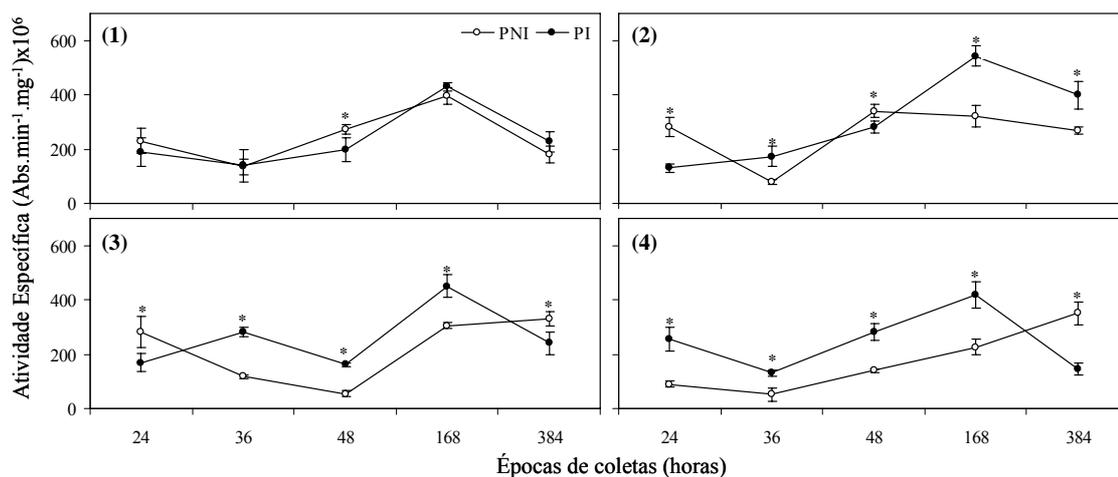


Figura 12. Curvas de progresso da atividade enzimática de QUI em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de QUI aumentou no período de 24 a 168 horas em folhas de plantas inoculadas, atingindo um pico e em seguida decresceu até as 384 horas (Figura 12). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima diminuiu de 24 a 36 horas, aumentou até a 48ª hora e manteve tendência decrescente no decorrer das épocas de coletas até as 384 horas.

Observou-se uma similaridade nos perfis de atividade de QUI no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno no período de 36 a 168 horas, diferenciando nos níveis de atividade mais elevados nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas (Figura 12). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade

da enzima apresentou tendência decrescente após as 168 horas, enquanto nas folhas de plantas não inoculadas mostrou-se constante.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de QUI em folhas de plantas inoculadas foi maior que em folhas de plantas não inoculadas em todas as épocas de coletas, exceto às 384 horas, atingindo um pico às 168 horas após inoculação com o patógeno (Figura 12). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima seguiu perfil similar, porém com níveis mais baixos que nas plantas inoculadas.

4.2.3.3. Lipoxigenases (LOX)

Observou-se que a atividade de LOX em folhas de plantas inoculadas com o patógeno e que receberam a aplicação de água (controle) foi menor que em folhas de plantas não inoculadas em quase todas as datas de coletas (Figura 13). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade manteve-se com tendência decrescente até as 168 horas e a partir desta aumentou até as 384 horas. Este aumento coincidiu com o aparecimento dos sintomas da ferrugem às 168 horas aproximadamente. Nas folhas de plantas não inoculadas a atividade da enzima aumentou de 24 a 36 horas e em seguida tendeu a decrescer até as 168 horas, quando passou a ser constante.

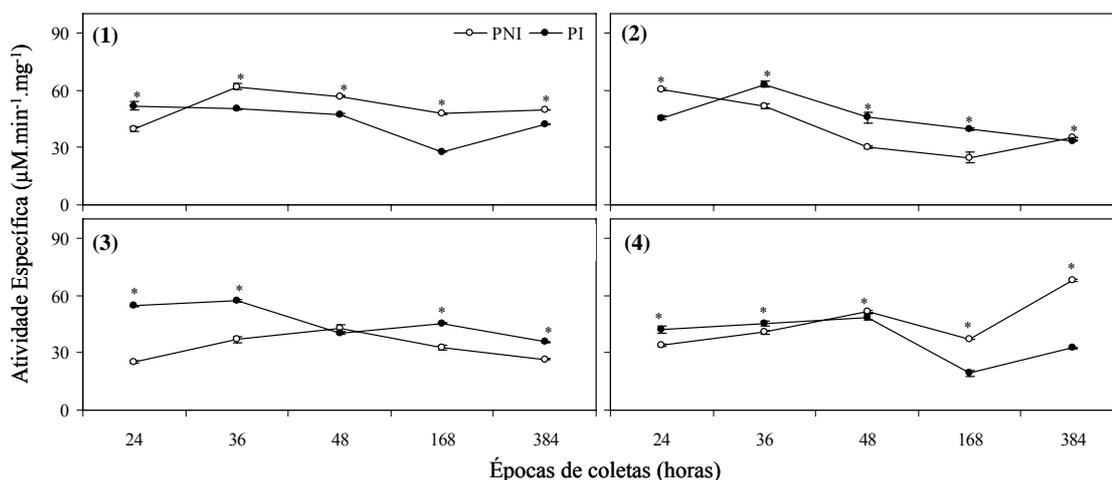


Figura 13. Curvas de progresso da atividade enzimática de LOX em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de LOX aumentou no período de 24 a 36 horas em folhas de plantas inoculadas, atingindo um pico e em seguida decresceu até as 384 horas (Figura 13). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima diminuiu no decorrer das épocas de coletas de 24 a 168 horas e manteve tendência crescente até as 384 horas.

Observou-se uma oscilação no perfil de atividade de LOX no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas com o patógeno (Figura 13). A atividade aumentou no período de 24 a 36 horas e diminuiu a partir das 168 horas nas plantas inoculadas e não inoculadas, porém com intensidades distintas, além disso, apresentaram um ponto de similaridade às 48 horas após inoculação.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de LOX seguiu perfil enzimático similar em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas em todas as épocas de coletas, porém com níveis diferentes (Figura 13). A atividade da enzima aumentou de 24 a 48 horas e em seguida houve um decréscimo até as 168 horas após inoculação com o patógeno. Após as 168 horas a atividade apresentou tendência crescente.

4.2.3.4. Fenilalanina amônia-liase (PAL)

Observou-se que a atividade de PAL em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) foi maior que em folhas de plantas não inoculadas de 24 a 48 horas, seguindo perfil enzimático similar tendendo a decrescer no decorrer destas datas (Figura 14). Posteriormente, a atividade aumentou até as 168 horas, atingindo um pico. Este aumento coincidiu com o aparecimento dos sintomas da ferrugem nas folhas às 168 horas aproximadamente. Após as 168 horas a atividade enzimática diminuiu até as 384 horas.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de PAL aumentou no período de 24 a 168 horas em folhas de plantas inoculadas, atingindo um pico e em seguida decresceu até as 384 horas (Figura 14). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima

diminuiu no decorrer das épocas de coletas de 24 a 48 horas e manteve tendência constante até as 384 horas.

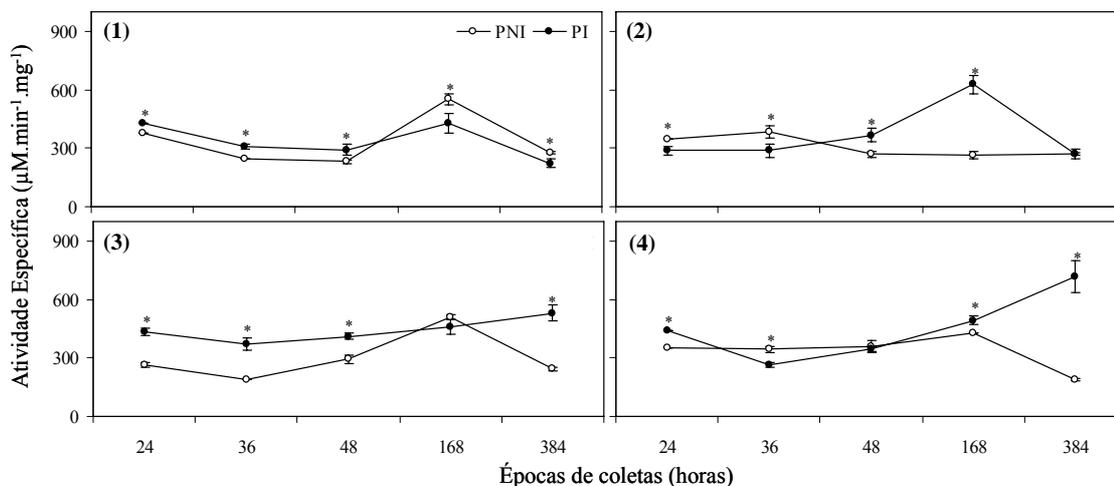


Figura 14. Curvas de progresso da atividade enzimática de PAL em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Observou-se um perfil similar de atividade de PAL no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno de 24 a 168 horas, em que a atividade manteve-se crescente no decorrer destas épocas (Figura 14). Posteriormente às 168 horas a atividade continuou aumentando para as plantas inoculadas e diminuiu para as plantas não inoculadas até as 384 horas.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de PAL apresentou-se constante no período de 24 a 168 horas em folhas de plantas não inoculadas e em seguida diminuiu até as 384 horas (Figura 14). Nas folhas de plantas inoculadas a atividade da enzima diminuiu de 24 a 36 horas e em seguida houve um aumento no decorrer das épocas de coletas até as 384 horas após inoculação com o patógeno.

4.2.3.5. Peroxidases (POD)

Observou-se que a atividade de POD em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) foi maior que nas plantas não inoculadas

em quase todas as datas (Figura 15). A atividade foi oscilante ao longo do tempo, atingindo pico às 48 horas após inoculação. Nas plantas não inoculadas a atividade enzimática diminuiu de 24 a 36 horas, permaneceu constante até as 168 horas e em seguida manteve-se com tendência decrescente até as 384 horas.

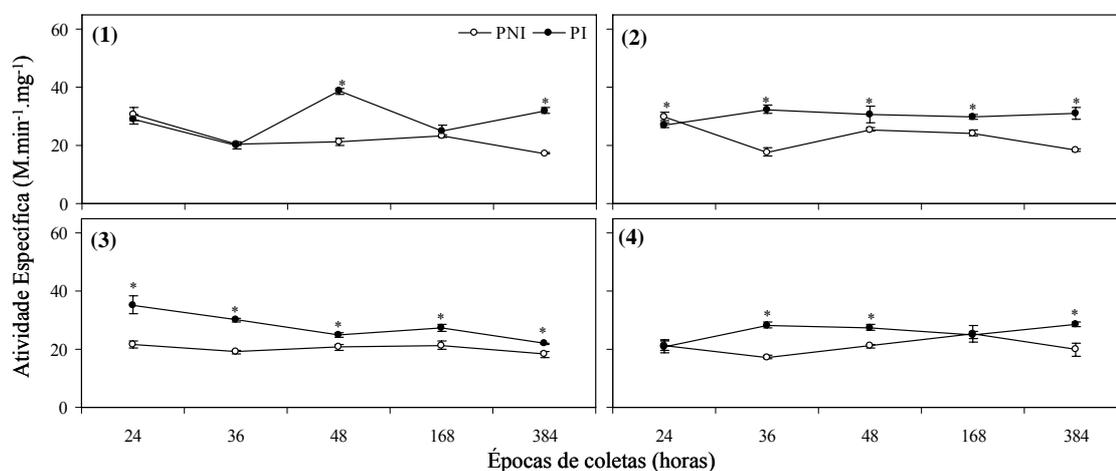


Figura 15. Curvas de progresso da atividade enzimática de POD em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de POD aumentou no período de 24 a 36 horas em folhas de plantas inoculadas e em seguida manteve-se constante até as 384 horas (Figura 15). Nas folhas de plantas não inoculadas, a atividade da enzima diminuiu de 24 a 36 horas, aumentou até às 48h, voltando a diminuir até as 384 horas, seguindo perfil enzimático com níveis menores que as plantas inoculadas.

Observou-se um perfil de atividade de POD no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas com níveis maiores que as plantas não inoculadas com o patógeno no decorrer das épocas de coletas (Figura 15). Nas plantas inoculadas a atividade apresentou tendência decrescente, enquanto nas plantas não-inoculadas a atividade da enzima manteve-se constante ao longo do tempo.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de POD apresentou-se maior em folhas de plantas inoculadas do que em plantas não inoculadas em quase todas as épocas de coletas (Figura 15). Nas folhas

de plantas inoculadas a atividade da enzima aumentou após as 168 horas, enquanto nas plantas não inoculadas a atividade apresentou decréscimo neste mesmo período até as 384 horas após inoculação com o patógeno.

4.2.3.6. Polifenoloxidasas (PPO)

Observou-se que a atividade de PPO em folhas de plantas inoculadas que receberam a aplicação de água (controle) foi menor que em folhas de plantas não inoculadas em quase todas as épocas de coletas (Figura 16). Nas plantas não inoculadas a atividade enzimática manteve-se decrescente no decorrer das épocas de coletas até as 168 horas, onde apresentou tendência crescente. Nas plantas inoculadas a atividade apresentou-se oscilante ao longo do tempo, atingindo um pico às 168 horas e posteriormente houve um decréscimo até as 384 horas.

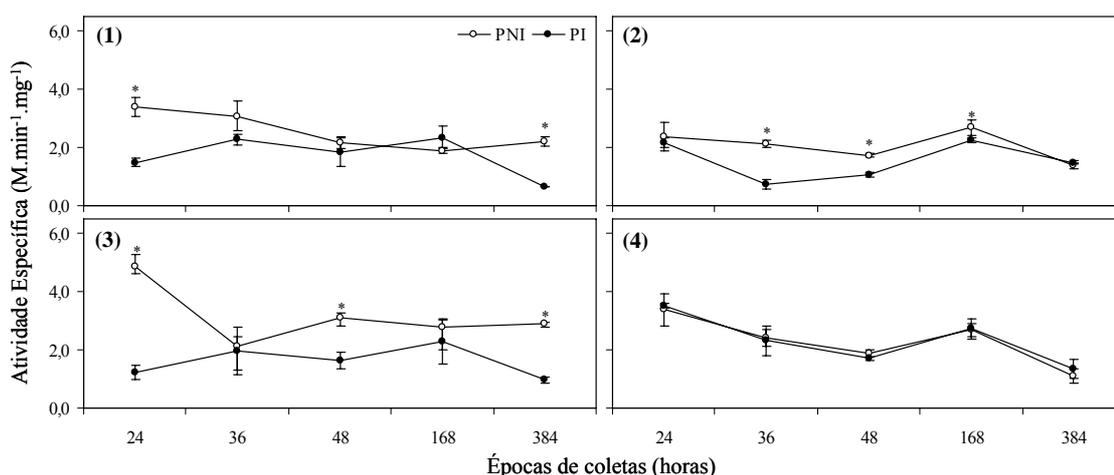


Figura 16. Curvas de progresso da atividade enzimática de PPO em plantas não inoculadas (PNI) e inoculadas (PI) que receberam os seguintes tratamentos: controle (água) (1); silicato de potássio (pH 10,2) (2); silicato de potássio (pH 5,5) (3) e Acibenzolar-S-Metil (4). Os asteriscos indicam que os valores médios são significativamente diferentes entre PNI e PI em cada época de coleta, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

No tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 10,2 observou-se que a atividade de PPO oscilou no período de 24 a 48 horas em folhas de plantas inoculadas, enquanto decresceu em plantas não inoculadas (Figura 16). Após a 48^a hora os perfis enzimáticos foram similares para as plantas inoculadas ou não com o patógeno, porém apresentando níveis de atividade distintos, mantendo tendência decrescente após as 168 horas.

Observou-se um perfil oscilante de atividade de PPO no tratamento correspondente à aplicação de silicato de potássio pH 5,5 em folhas de plantas inoculadas no decorrer das épocas de coletas (Figura 16). A atividade da enzima decresceu após as 168 horas. As folhas das plantas não inoculadas apresentaram atividade maior que as plantas inoculadas em quase todas as datas, decrescendo de 24 a 26 horas, aumentando até as 48 horas, onde seguiu com tendência constante até as 384 horas.

No tratamento correspondente à aplicação de ASM observou-se que a atividade de PPO apresentou perfil idêntico em folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno ao longo do tempo, inclusive em termos de valores (Figura 16). A atividade manteve-se decrescente até a 48ª hora, aumentou até as 168 horas e em seguida diminuiu até as 384 horas.

5. DISCUSSÃO

A aplicação foliar de silicato de potássio e de Acibenzolar-S-Metil nos experimentos de cafeeiro e soja reduziram alguns componentes de resistência em resposta à infecção por *H. vastatrix* e *P. pachyrhizi*, respectivamente, em comparação ao tratamento controle. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos com os mais variados patossistemas em que o uso da nutrição mineral através da utilização de Si e a indução de resistência através da utilização do ASM, reduziram a severidade da ferrugem e de diversas doenças em várias culturas importantes (AMARAL, 2005; BÉLANGER, et al., 2003; BOKSHI et al., 2003; CARVER, 1998; DANTAS et al., 2004; FAGGIANI, 2002; FAIZE et al., 2004; GUZZO et al., 2004; LIMA, 1998; POZZA et al., 2004; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Houve uma diferença na severidade e número de pústulas por folha da ferrugem do cafeeiro e na severidade da ferrugem asiática da soja entre os dois tratamentos com silicato de potássio (tratamentos 2 e 3). A aplicação no pH 5,5 apresentou menor severidade que a aplicação no pH 10,2. Isto pode ser devido ao fato de que em valores de pH alcalinos, onde o silicato é mais estável, a solução não se polimeriza tão prontamente quanto em pH mais ácido, e com isso a barreira física seria estabelecida mais rapidamente no tratamento 3 do que no tratamento 2. Não se deve descartar a possibilidade de ter ocorrido efeito do potencial osmótico gerado pela presença do silicato sobre a folha, podendo ter afetado a viabilidade dos uredósporos (BOWEN et al., 1992).

No que se refere à ativação de respostas bioquímicas da planta em defesa ao ataque por *H. vastatrix* através da alteração nos níveis enzimáticos, pôde-se observar que atipicamente as enzimas POD, PPO e GLU não tiveram seus valores de atividade aumentados quando inoculadas com o fungo no tratamento controle. Por outro lado, as enzimas QUI, PAL e LOX apresentaram aumento nas suas atividades quando as plantas foram inoculadas, o que é coerente com alguns estudos em que os autores investigaram as alterações das enzimas QUI, PAL e LOX em resposta à inoculação de fitopatógenos (ANGUELOVA-MERHAR et al., 2001; ROJAS et al., 1993; SILVA et al., 2002).

Na cultura da soja, observou-se que as enzimas PPO, LOX, QUI e PAL também não tiveram seus valores de atividade aumentados quando inoculadas com o

fungo no tratamento controle. Estes resultados discordam de alguns autores que estudaram a atividade das enzimas PPO, LOX, QUI e PAL em resposta às infecções patogênicas (AMARAL, 2005; MOHAMMADI et al., 2001; ROJAS et al., 1993; SILVA et al., 2002;). Por outro lado, as enzimas GLU e POD apresentaram aumento nos níveis de suas atividades quando as plantas foram inoculadas, corroborando com alguns autores que estudaram as enzimas GLU e POD (ANGUELOVA-MERHAR et al., 2001; XUE, et al., 1998).

Não se deve descartar a hipótese de terem ocorrido mudanças nas isoformas das enzimas impossíveis de serem medidas ou que essas mudanças tenham acontecido em períodos diferentes das épocas de coleta, podendo ter afetado seus padrões enzimáticos (RESENDE et al., 2000). Além disso, as isoformas de enzimas presentes nas plantas variam quantitativa e qualitativamente, de acordo com a espécie, o tecido vegetal, o estágio fenológico e a influência do ambiente (GALSTON & DAVIES, 1969). Outros fatores tais como a luz, a temperatura, o pH ou qualquer outro tipo de estresse, podem contribuir para tais mudanças na diversidade de isoformas dessas enzimas (SIEGEL, 1993).

Alguns trabalhos com estudo do efeito de indutores na resistência de cafeeiro a *H. vastatrix* e *Cercospora coffeicola* mostraram aumentos nas atividades das enzimas POD e PPO em relação a plantas saudias, que receberam a aplicação de ASM (AMARAL, 2005; NOJOSA, 2003). De um outro lado, estudos com indução de resistência de feijoeiro à *murcha-de-curtobacterium* mostraram certa ineficiência do ASM em maximizar a atividade destas enzimas (SOARES et al., 2004). Este resultado suporta a hipótese de que este pode não ser o mecanismo pelo qual ASM ativa alguma resposta de defesa (RODRIGUES et al., 2006). Além disso, no presente trabalho, observou-se que a atividade de LOX em folhas de plantas de soja foi menor em plantas inoculadas do que em plantas não inoculadas, tratadas com ASM.

Os estudos sobre o efeito dos indutores de resistência sobre a atividade das proteínas-RP mostram na sua maioria aumento na atividade das enzimas GLU e QUI. Essas hidrolases estão envolvidas diretamente na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos, especialmente aqueles ditos hemibiotróficos e necrotróficos (ANGUELOVA-MERHAR et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005). Trabalhos a respeito da indução de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita mostraram aumento na atividade de GLU, bem como de QUI em trabalhos com resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* e resistência à *murcha-de-Fusarium* em

caupi (DANTAS et al., 2004; GUZZO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006). No presente trabalho, observou-se que a atividade de QUI foi maior em folhas de mudas de café inoculadas do que em plantas não inoculadas, porém ao se comparar as plantas tratadas com ASM com estas plantas controle, verificou-se que o ASM induziu a expressão de QUI. Resultado diferente ocorreu no experimento com plantas de soja.

Estudos com a enzima chave na etapa inicial do processo de lignificação relacionados com a resistência da pêra japonesa à *Venturia nashicola*, mostraram que o ASM contribuiu para maximizar a atividade enzimática de PAL (FAIZE et al., 2004). Outro estudo importante mostrou acréscimos na atividade de PAL em feijão em resposta à *Colletotrichum lindemuthianum*, embora se tenha utilizado o Ácido Salicílico (AS) ao invés do ASM (CAMPOS et al., 2003). Não foram encontrados na literatura trabalhos com LOX, a qual está envolvida na degradação de ácidos graxos na membrana plasmática, utilizando-se o ASM. Porém, vários trabalhos relatam o aumento da atividade frente ao ataque por insetos, patógenos ou ferimentos (FORTUNATO et al., 2004; 2007).

O interesse pelo estudo de patossistemas envolvendo plantas dicotiledôneas controladas por Si surgiu dos resultados promissores obtidos com monocotiledôneas, pois estas absorvem grandes quantidades deste elemento via solo (BÉLANGER et al., 2003; DATNOFF et al., 1997; EPSTEIN, 2001; RAID et al., 1992;). Além destes estudos, outro trabalho relata o efeito do Si no controle de várias doenças do arroz, planta tipicamente acumuladora de Si (DATNOFF et al., 1991). Entretanto, no presente estudo trabalhou-se com cafeeiro, planta que se sabe até o presente momento não tratar de uma acumuladora de Si, e plantas de soja, intermediárias no acúmulo de Si.

O controle da ferrugem observado no presente estudo através da nutrição mineral com a aplicação de Si via foliar deve ser atribuído ao silicato aplicado, uma vez que antes das análises dos teores foliares de Si serem feitas, as folhas foram lavadas e retirou-se todo o Si depositado sobre a superfície das mesmas. Com isso, pode-se inferir que o controle da doença deve ter sido principalmente por meio da barreira física criada pela polimerização do silicato de potássio, dificultando a penetração do patógeno, ou até mesmo inviabilizando a sua estrutura reprodutiva. Isso contribuiu de forma significativa para o decréscimo do número de pústulas por folha e severidade da ferrugem do café e severidade da ferrugem asiática da soja.

Neste trabalho, as atividades de todas as enzimas expressas pelas folhas do cafeeiro e da soja, tratadas com silicato de potássio via foliar em plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno não mostraram, em geral, níveis diferentes das atividades enzimáticas observadas no tratamento controle. Esta observação leva a crer que a indução destas enzimas foi exclusivamente potencializada pela presença do patógeno e não pela aplicação do Si. Além disso, vários aspectos devem ter contribuído para essa paridade entre os tratamentos, especialmente fatores inerentes ao erro experimental como, por exemplo, alterações na fisiologia das plantas.

Vários autores relatam que o Si pode atuar como barreira estrutural de modo a impedir a penetração de fungos e afetar os sinais entre o hospedeiro e o patógeno, resultando na ativação mais rápida e extensiva dos mecanismos pós-formados de defesa (CHÉRIF et al., 1992; 1994; EPSTEIN, 1999). Neste contexto, o que pode ter acontecido para que os componentes de resistência avaliados tenham sido diminuídos foi a ação deste elemento proporcionando células epidérmicas com a parede celular mais espessa devido à deposição de sílica nas mesmas (BLAICH & GRUNDHÖFER, 1998). Este fato pode ter favorecido a resistência às ferrugens.

A presença do Si na camada externa da epiderme foi observada por Carver et al. (1987). Outros autores observaram que a complexação do Si com compostos fenólicos na parede das células epidérmicas pode reduzir e dificultar a expansão das lesões, bem como a intensidade da doença, por tornar as células mais rígidas (KIM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2001). Essas constatações podem afetar a epidemiologia da doença reduzindo a penetração e contribuindo para menor esporulação do fungo. Caso os eventos aqui observados seguiram realmente estas observações, pode-se deduzir que a planta então não precisaria usar seus recursos metabólicos para investir em respostas de defesa.

Na literatura, os trabalhos a respeito da aplicação foliar de Si relacionada com respostas através dos mecanismos bioquímicos são raros. Contudo, um trabalho nesta área avalia esses aspectos na cultura do pepino inoculada com *Podosphaera xanthii* (LIANG et al., 2005). No referido estudo, verificou-se aumentos significativos da atividade das enzimas POD, PPO, PAL e QUI após inoculação das plantas em comparação com plantas saudáveis. Porém, estes resultados são devidos à aplicação do Si via raiz. Outro estudo corrobora com estas conclusões (YANG et al., 2003).

No que diz respeito à aplicação foliar de Si, Gozzo (2003) afirma que a inoculação das plantas pode ocasionar RSA, porém o Si via foliar não seria capaz de

induzir tal resposta. Em adição, Samuels et al. (1991) afirma que uma vez depositado na parede celular, o Si é imobilizado e não é mais retranslocável. O trabalho realizado por Liang et al. (2005) que corrobora os resultados aqui apresentados, mostrou que as atividades das enzimas POD, PPO, PAL e QUI não apresentaram alteração significativa em resposta à infecção, em plantas tratadas com Si via foliar e obteve o mesmo resultado em plantas não inoculadas tratadas com este elemento.

Além desses autores, outros estudos do efeito da aplicação foliar de Si para controle de oídio em pepino, melão, abóbora e uva mostraram que este elemento aplicado via foliar reduziu a severidade das doenças. Contudo, isto deveria ser atribuído ao papel de atuação físico deste elemento, depositando-se na superfície das folhas e/ou por efeito osmótico do silicato de potássio aplicado via foliar em uma alta concentração (BOWEN et al., 1992; MENZIES et al., 1992). Estes autores também mostraram que a função do Si aplicado via raiz aumentou a resistência dessas plantas, porém por meio da ativação de mecanismos pós-formados de defesa.

6. CONCLUSÕES

A aplicação foliar de silicato de potássio reduziu significativamente a ferrugem nas folhas das mudas de cafeeiro e a ferrugem asiática em folhas das plantas de soja.

O tratamento com silicato de potássio via foliar no pH 5,5 foi mais efetivo que o tratamento com silicato de potássio no pH 10,2 na redução dos componentes de resistência.

A aplicação foliar de Acibenzolar-S-Metil reduziu expressivamente a ferrugem no experimento de café e a ferrugem asiática no experimento da soja.

Não houve variação nos teores foliares de Si e K, independente dos tratamentos e da inoculação ou não inoculação das plantas de café e soja.

A indução das enzimas GLU, QUI, LOX, PAL, POD e PPO foram exclusivamente potencializadas pela presença do patógeno.

O Si via foliar deve ter atuado por meio da barreira física criada pela polimerização do silicato de potássio, com efeito negativo sobre o estabelecimento do patógeno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE (www.abiove.com.br), 2007.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YONORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, São Paulo-SP:Agropecuária Ceres, v. 2, p. 569-588, 2005.

AMARAL, D.R.. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. Tese (Mestrado), Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras, 2005.

ANGUELOVA-MERHAR, V. S.; VAN DER WESTHUIZEN, A. J.; PRETORIUS, Z. A. β -1,3-Glucanase and Chitinase Activities and the Resistance Response of Wheat to Leaf Rust. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 381-384, 2001.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, v. 71, p. 441-451, 1981.

AZEVEDO, L. A. S. **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo-SP, 230p, 2001.

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**, v. 93, p. 402-412, 2003.

BÉLANGER, R. R.; MENZIES, J. G. Use of silicon to control diseases in vegetable crops. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36, Uberlândia-MG, **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 42-45, 2003.

BELL, E.; MULLET, J. E. Characterization of an arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1133-1137, 1993.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v. 14, p. 13-21, 1998.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, São Paulo-SP:Agropecuária Ceres, v. 1, p. 13-31, 1995.

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**, v. 118, p. 1067-1078, 1998.
- BLAICH, R.; GRUNDHÖFER, H. Silicate incrusts induced by powdery mildew in cell walls of different plant species. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 105, p. 114-120, 1998.
- BOHLAND, C.; BALKENHOHL, T.; LOERS G.; FEUSSNER I.; GRAMBOW, H. J. Differential induction of lipoxygenases isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 114, p. 679-685, 1997.
- BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; DEVERALL, B. J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, v. 52, p. 22-27, 2003.
- BOL, J. F.; LINTHORST, H. J.; CORNELISSEN, B. J. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p.113-138, 1990.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, v. 13, p. 11-27, 2005.
- BOWEN, P.; MENZIES, J.; EHRET, D. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, p. 906-912, 1992.
- BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 59, p. 873-907, 1990.
- BRACCINI, A. L.; MOTTA, I. S.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, M. C. L.; AVILA, M. R.; SCHUA, B. Semeadura da soja no período de safrinha: Potencial fisiológico e sanidade das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 76-86, 2003.
- BROGLIE, K.; CHET, I.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C. J.; BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, v. 254, p. 1194-1197, 1991.
- BUNKER, T. W.; KOETJE, D. S.; STEPHENSON, L. C.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; GRIMES, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, v. 7, p. 1319-1331, 1995.
- CAHILL, D. M.; McCOMB, J. A. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora*

- cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 40, n. 4, p. 315-332, 1992.
- CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.
- CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte-MG:EPAMIG, v. 23, n. 214, p. 101-114, 2002.
- 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**, v. 52, p. 223-243, 1998.
- CARVER, T. L. W.; ZEYEN, R. J.; AHLSTRAND, G. G. The relationship between insoluble silicon and success or failure of attempted primary penetration by powdery mildew (*Erysiphe graminis*) germinating on barley. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 31, p. 133-148, 1987.
- CASTRO, R. M. Bion: a experiência brasileira. In: Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos, São Pedro. **Anais...** São Pedro-SP: ESALQ, p. 12-13, 2002.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERRO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, v. 13, p. 81-124, 2005.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**. New York, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CHÉRIF, M., ASSELIN, A.; BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium spp*. **Phytopathology**, v. 84, p. 236-242, 1994.
- CHÉRIF, M., BENHAMOU, N., MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 411-425, 1992.
- CHET, I. **Biotechnology in plant disease control**. Wiley-Liss, New York, 1993.
- CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas-SP, v. 32, p. 167-171, 1998.

- COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant Chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.
- CROFT, K. P. C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, v. 101, p. 13-24, 1993.
- CRUSCIOL C. A. C.; PULZ, A. L.; LEMOS, L. B.; SORATTO, R. P. Adubação silicatada e estresse hídrico em batata. In: IV Simpósio Brasileiro sobre Silício na Agricultura. **Anais...** Botucatu-SP, p. 218-221, 2007.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E. COELHO, E. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 314-319, 2004.
- DATNOFF, L. E.; DEREN, C. W.; SNYDER, G. H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. **Crop Prot**, v. 16, n. 6, p. 525-531, 1997.
- DATNOFF, L. E.; RAID, R. N.; SNYDER, G. H., JONES, D. B. Effect of calcium silicate on brusone and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disease**, v. 75, n. 7, p. 729-732, 1991.
- DIXON, R. A.; HARRISON, M. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 165-234, 1990.
- EMBRAPA (www.embrapa.br), 2007.
- Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>), 2007.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants: facts vs. concepts. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Studies in plants in Plant Science, 8. Elsevier: Amsterdam-Holland, p. 1-15, 2001.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 641-664, 1999.
- FAGGIANI, E. P. **O silício na defesa de limão rugoso (*Citrus jambhiri*) a *Phytophthora nicotianae* pv. *Parasítica***. Tese (Mestrado), Piracicaba-SP, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.
- FAIZE, M.; FAIZE, L.; KOIKE, N.; ISHIZAKA, M. ISHII, H. Acibenzolar-S-metil-induced resistance to Japanese pear scab is associated with Potentiation of multiple defense responses. **Phytopathology**, v. 96, p. 604-612, 2004.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the syntesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, v. 4, p. 129-134, 1992.

- FAWE, A.; MENZIES, J. G.; CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Studies in plants in Plant Science, 8. Elsevier: Amsterdam-Holland. p. 159-169, 2001.
- FAZUOLI, L. C.; FILHO, H. P. M.; GONÇALVES, W.; FILHO, O. G.; SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do Cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O Estado da arte de Tecnologias de Produção de Café**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 163-216, 2002.
- FIDANTSEF, A. L.; BOSTOCK, R. M. Characterization of potato tuber lipoxygenase cDNAs and lipoxygenase expression in potato tubers and leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 257-271, 1998.
- FINK, W.; DEISING, H.; MENDGEN, K. Early defense responses of cowpea (*Vigna sinensis* L.) induced by non-pathogenic rust fungi. **Planta**, v. 185, p. 246-254, 1991.
- FONSECA, I. M.; PRADO, R. M.; VIDAL, A. A.; NOGUEIRA, T. A. R. Efeito da escória e do calcário na disponibilidade de silício no solo. In: IV Simpósio Brasileiro sobre Silício na Agricultura. **Anais...** Botucatu-SP, p. 26-28, 2007.
- FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; ZANÚNCIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; PILON, A. M.; ALMEIDA, F. T.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Effect of the *Anticarsia gemmatilis* injury on the lipoxygenases activity from soybean leaves. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, n. 2, p. 37-46, 2004.
- FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. de A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C., MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Journal of Pest Science**, 2007.
- GALSTON, M. D.; DAVIES, P. J. Hormonal regulation in higher plants. **Science**, v. 163, p. 1288-1297, 1969.
- GASCHO, G. J. Silicon source for agriculture. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Studies in plants in Plant Science, 8. Elsevier: Amsterdam-Holland, p. 197-208, 2001.
- GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63 - 68, 2006.
- GOGOI, R.; SINGH, D. V.; SRIVASTAVA, K. D. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. **Plant Pathology**, v. 50, p. 470-476, 2001.
- GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoxidase de feijão

- (*phaseolus vulgaris* l.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 21, n. 1, p. 69-72, 2001.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 1055-1062, 2004.
- GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H. OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, 1996.
- GOZZO, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4487-4503, 2003.
- GRAHAM, M. Y.; GRAHAM, T. L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea wall glucan. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1445-1455, 1991.
- GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G; FELIZ, C. R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.
- GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M. De; KYDA, K. MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-S-metil em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.
- GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; LUCON, C. M. M.; TSAI, S. M. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β -1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 376-381, 2004.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 40, p. 347-369, 1989.
- HAM, K. S.; KAUFFMANN, S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Host-pathogen interactions. A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 545-552, 1991.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; PIETRO, A. di.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, 83:313-318, 1993.

- HEITZ, T.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1085-1093, 1997.
- JACH, G.; GÖRNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 8, p. 97-109, 1995.
- JACOBS, A. S.; PRETORIUS, Z. A.; KLOPPERS, F. J.; COX, T. S. Mechanisms associated with wheat leaf rust resistance derived from *Triticum monococcum*. **Phytopathology**, v. 86, p. 588-595, 1996.
- JI, C.; KUC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.
- KANTO, T.; MIYOSHI, A.; OGAWA, T.; MAEKAWA, K.; AINO, M. Suppressive effect of potassium silicate on powdery mildew of strawberry in hydroponics. **Journal of General Plant Pathology**, The Phytopathological Society of Japan, v. 70, p. 207-211, 2004.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**. Rockville, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- KIM, S. G.; KIM, K. W.; PARK, E. W.; CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, v. 92, p. 1095-1103, 2002.
- KIM, S. G.; KIM, K. W.; PARK, E. W.; CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, v. 92, p. 1095-1103, 2002.
- KORNDÖRFER, G. H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, p. 355-374, 2006.
- KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; NOLLA, A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia-mg:GPSi/ICIAG/UFU, 34p, 2004.
- KUSHALAPPA, A.C.; CHAVES, G.M. Escala para avaliar a percentagem de área foliar com ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 119, 1978.
- KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. N. F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1237-1245, 1997.
- LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M.; DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, v. 56, p. 215-224, 1989.

- LAMB, C.; DIXON, R. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.
- 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**, v. 8, p. 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**, v. 266, p. 1564-1573, 1991.
- 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**, v. 144, p. 79-87, 1996.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 393-414, 1995.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 273-279, 1972.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, p. 583-593, 1994.
- 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**, v. 264, p. 14486-14492, 1989.
- LIANG, Y. C.; SUN, W. C.; SI, J.; RÖMHELD, V. Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant Pathology**, v. 54, p. 678-685, 2005.
- LIMA, M. T. G. **Interrelação cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis*), nodulação (*Bradyrhizobium japonicum*) e silício em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Tese (Doutorado), Piracicaba-SP, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 1998.
- LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 123-150, 1991.
- LOW, P. S.; MERIDA, J. R. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. **Plant Physiology**, v. 96, p. 533-542, 1996.

- MA, J. F.; TAKAHASHI, E. **Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan**. Elsevier Science. Kyoto-Japan, 281p, 2002.
- MA, J.F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Studies in plants in Plant Science, 8. Elsevier: Amsterdam-Holland, p. 17-39, 2001.
- MACK, A. J.; PETERMAN, T. K.; SIEDOW, J. N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological Medical Research**, v. 13, p. 127-54, 1987.
- MAREK, S. M.; ROBERTS, C. A.; KARR, A. L.; SLEPER, D. A. Chitinase Activity in Tall Fescue Seedlings as Affected by Cultivar, Seedling Development, and Ethephon. **Crop Science** , v. 40, p. 713–716, 2000.
- MARSCHENER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, San Diego-CA, 674p, 1995.
- MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. Cultura do Café no Brasil. In: MATIELLO, J. B. (Ed). **Novo Manual de Recomendações. MAPA/PROCAFÉ**. Rio de Janeiro-RJ, 387p, 2002.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, p. 936-942, 1988.
- McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. Heat stability of peroxidase from orange. **Food Chemistry**, Barking, v. 13, p. 139-147, 1984.
- MELAN, M. A.; DONG, X.; ENDARA, M. E.; DAVIS, K. R.; AUSUBEL, F. M.; PETERMAN, T. K. An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 101, p. 441-450, 1993.
- MENZIES, J.; BOWEN, P.; EHRET, D. Foliar application of potassium silicate reduce severity of powdery mildew development on cucumber, muskmelon and zucchini squash. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, p. 902-905, 1992.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1956.
- MILOSEVIC, N.; SLUSARENKO, A. J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 143-158, 1996.
- MOERSCHBACHER, B.; NOLL, U.; GORRICHON, L.; REISENER, H. J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. **Plant Physiology**, v. 93, p. 465-470, 1990.

- 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**, v. 154, p. 119–126, 2002.
- MOHAMMADI, M.; ROOHPARVAR, R.; MOHAMMAD, T. Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, the causal agente of yellow rust disease. **Mycopathologia**, v. 154, p. 119-126, 2001.
- MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, Embrapa Trigo, v. 6, p. 261-284, 1998.
- MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of β -1,3-glucanases activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1381-1387, 2000.
- NEUHAUS, J. Plant Chitinases. In: Datta and Muthukrishnan (Eds.). **Pathogenesis-related proteins**. CRC Press, Boca Raton, FL, p.77-106, 1999.
- NOJOSA, G. B. de A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi**, Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2003.
- NOLLA, A.; KORNDÖRFER, G.H. produção de cana-de-açúcar e correção de acidez em neossolo submetido à aplicação de carbonato e silicato de cálcio. In: IV Simpósio Brasileiro sobre Silício na Agricultura. **Anais...** Botucatu-SP, p. 30-33, 2007.
- OKINAKA, Y.; MIMORI, K.; TAKEO, K.; KITAMURA, S.; TAKEUCHI, Y.; YAMAOKA, N.; YOSHIKAWA, M. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, v. 109, p. 839-845, 1995.
- PARK, T. K.; HOLLAND, M. A.; LASKEY, J. G.; POLACCO, J. C. Germination-associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, v. 96, p. 109-117, 1994.
- PASCHOLATI, S. F. Resultados com resistência induzida no Brasil. In: Simpósio de biologia molecular da resistência de plantas a patógenos: aplicações no manejo integrado de fitodoenças, Lavras. **Resumos**. Lavras-MG:Universidade Federal de Lavras, p. 9, 2002.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo-SP:Agropecuária Ceres, v. 1, p. 417-453, 1995.

- 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 (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Viçosa, 1998.
- PELICICE, F. M., DIETRICH, S. M.C., BRAGA, M. R. Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 45-53, 2000.
- POZZA, A. A. A.; ALVES, E., POZZA, E. A.; BOTELHO, D. M. S. O silício no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 12, p. 373-402, 2004a.
- POZZA, A. A. A.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G. de; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P. T. G.; SANTOS, D. M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 185-188, 2004b.
- PRADO, R. M.; FONSECA, I. M.; VIDAL, A. A.; SOUZA, F. V.; NOGUEIRA, T. A. R. Acúmulo de silício em plantas de braquiária no segundo corte em função da aplicação de calcário, escória de siderurgia e nitrogênio. In: IV Simpósio Brasileiro sobre Silício na Agricultura. **Anais...** Botucatu-SP, p. 18-21, 2007.
- PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. **J. Nematol**, v. 25, p. 526-540, 1993.
- RAID, R. N.; ANDERSON, D. L.; ULLOA, M. F. Influence of cultivar and amendment of soil with calcium silicate slag on foliar disease development and yield of sugarcane. **Crop Prot.**, v. 11, n. 1, p. 84-88, 1992.
- REIMERS, P. J.; GUO, A.; LEACH, J. E.; Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). **Plant Physiology**, v. 99, p. 1044-1050, 1992.
- RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; RESENDE, R. S.; BESERRA Jr, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Induction or resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The Internacional Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance**. University of Fribourg, p. 79, 2004.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazolone (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 149-156, 2000.
- ROBERTS, W. K.; C. P. SELITRENNIKOFF. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 169-176, 1988.

- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.
- RODRIGUES, F. Á. **Fertilização silicatada na severidade da queima das bainhas (*Rhizoctonia solani* Kühn) do arroz**. Tese (Mestrado), Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 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**, v. 85, p. 827-832, 2001.
- RODRIGUES, F.A., BENHAMOU, N.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; BÉLANGER, R.R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 535-546, 2003.
- RODRIGUES, F.A.; JURICK W.M.; DATNOFF L.E.; JONES J.B.; ROLLINS J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 66, p. 144-159, 2005.
- ROESSING, A. C. (www.cnpso.embrapa.br), 2007.
- ROJAS, M. L.; GÓMEZ, V. M.; OCAMPO, C. A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 209-219, 1993.
- ROSSI, C.; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 197-199, 2001.
- ROUET-MAYER, M.; BUREAU, J.; LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiology**, v. 98 p. 971-978, 1992.
- SAMUELS, A. L.; GLASS, A. D. M.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Distribution of silicon supplementation on cucumber leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 140-146, 1991.
- SAMUELS, A. L.; GLASS, A. D. M.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. **Plant Cell Environ.**, v. 14, p. 485-492, 1991.
- SANTOS, D. M. dos. **Efeito do silício na intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2002.

- SARAVITZ, D. M.; SIEDOW, J. N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, v. 110, p. 287-299, 1996.
- SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The Mechanism of Action of Phenylalanine Ammonia-Lyase: The Role of Prosthetic Dehydrolanine. **Proceedings - National Academy Of Sciences USA**, v. 92, p. 8433-8437, 1995.
- SEEVERS, P. M.; DALY, J. M.; CATEDRAL, F. F. The role of Peroxidase Isozymes in Resistance to Wheat Stem Rust Disease. **Plant Physiology**, v. 48, p. 353-360, 1971.
- SEKI, H.; NAGASUGI, Y.; SHIRAIISHI, T.; YAMADA, T. Changes in vivo DNA protein interactions in pea phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase gene promoter induced by fungal signal molecules. **Plant Cell Physiology**, v. 40, p. 88-95, 1999.
- SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 145-188, 1991.
- SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.
- SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA (Org.), 370 p, 1999.
- SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V. Resistência induzida em plantas contra patógenos. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras-MG:Universidade Federal de Lavras, p. 221-239, 2001.
- SILVA, M. C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES Jr, C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, p. 169-183, 2002.
- SILVA, M. D.; OLIVEIRA, M. G. A.; LANNA, A. C.; PIRES, C. V.; PIOVESAN, N. D.; JOSÉ, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *diaphorte phaseolorum* f. Sp. *Meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 316-328, 2001.
- SILVA, O. A.; MATIELLO, J. B.; MANDON, L. Doses e formulações de fungicidas e inseticidas granulados sistêmicos aplicados no solo, no controle da ferrugem e bicho mineiro do cafeeiro. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Manhuaçu. **Resumos**, p. 131-133, 1997.

- SIMMONS, C. R. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -glucanases and 1,3;1,4- β -glucanases. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 325-387, 1994.
- SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Management of soybean rust. In: Soybean Rust Workshop. Urbana: College of Agricultural, **Consumer and environmental Sciences**, p. 6-10, 1995.
- SMITH, D. A.; BANKS, S. W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. **Phytochemistry**, v. 25, p. 979-995, 1986.
- SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na Indução de Resistência de Feijoeiro Comum à Murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, 2004.
- SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Ineficiência de acibenzolar-S-metil na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 373-377, 2004.
- SOUSA, V. B. F.; SOUSA, J. V.; CARVALHO Jr., P. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, S. P.; FIGUEIREDO, F. C. Aplicação foliar de silicato de potássio na soja: absorção de Si, severidade de ferrugem asiática e produtividade. In: IV Simpósio Brasileiro sobre Silício na Agricultura. **Anais...** Botucatu-SP, p. 102-106, 2007.
- STEPHENSON, L. C.; BUNKER, T. W.; DUBBS, W. E.; GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiology**, v. 116, p. 923-933, 1998.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.
- TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE, Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments on Agriculture and Food Chemical**, v. 2, p. 99-122, 1990.
- TROIANI, E. P.; TROIANI, C. T.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in grape (*vitis vinifera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 635-642, 2003.
- VALERO, E.; VARÓN, R.; CARMONA, G. F. Characterization of polyphenoloxidase from air grape. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 5, p. 1482-1485, 1988.
- VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES Jr., C. J.; SILVA, M. C. M. L.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D. V.; GUERRA, G. L.; RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemilia vastatrix*. In: Zambolim, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa-MG:Universidade Federal de Viçosa, p. 297-320, 2002.

- VAUGHN, S. F.; GARDNER, H. W. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 2337-2345, 1993.
- VICK, B.; ZIMMERMAN, D. C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P. K., CONN, E. E. (Eds.). **The Biochemistry of Plants**. Orlando:Academic Press, v. 9, p. 53-97, 1987.
- VIEIRA, A. A. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 5-12, 2001.
- WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isohering und kristallisation des grungsferments enolase. **Biochemistry Zoology**, n. 310, p. 384-421, 1941.
- WEN-CHI, H.; YING-CHOU, C.; YAW-HUEI, L. Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam var. Tainong 57). **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 39, p. 93-97, 1998.
- WHITAKER, J. R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O. R. (ed.). **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York:Marcel Dekker Inc, p. 543-556, 1994.
- XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate Rhizoctonia Species. **Phytopathology**, v. 88, p. 359-365, 1998.
- YANG, Y. F.; LIANG, Y. C.; LOU, Y. S. Influences of silicon on peroxidase, superoxide dismutase activity and lignin content in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) as related to resistance to powdery mildew. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 36, p. 813-817, 2003.
- YORINORI, J. T. Controle integrado das principais doenças da soja. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) **Soja: Tecnologia da produção**. Piracicaba-SP, p. 139-192, 2002.
- YORINORI, J. T.; GODOY, C. V.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. N.; BERTAGNOLLI, P. F.; NUNES, J. R. J. Evolução da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil, de 2001 a 2003. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia-MG. **Palestras e Resumos**. V. 28, 2003.
- YORINORI, J. T.; WILFRIDO, M. P. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi***. Londrina: Embrapa, 4p, 2002.
- ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glicine max* (L.) Merrill**. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2005.

- ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 156-160, 2007.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; COSTA, H.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O Estado da arte de Tecnologias de Produção de Café**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 369-450, 2002.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa-MG:Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília-DF, p. 83-179, 1997.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo-SP:Agropecuária Ceres, v. 2, p. 165-180, 2005a.
- ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; SAKYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. **Durable Resistance to Coffee leaf rust**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 75-98, 2005b.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanina deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**. Rockville, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.