

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JULIANA CAMARGO MARTINATI

Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício

Piracicaba -SP
Fevereiro/2008

JULIANA CAMARGO MARTINATI

Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Biologia na Agricultura e
Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba -SP
Fevereiro/2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Martinati, Juliana Camargo

Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício /
Juliana Camargo Martinati; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2008.
113 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área
de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ativação enzimática 2. Ferrugem (Doença de plantas) 3. Fungos
fitopatogênicos I. Título

CDU 632.08:633.73

Para aquelas pessoas que fazem meu coração sorrir...
Para aquelas que sempre estiveram junto até mesmo quando eu não
estava disposta...
Para as pessoas que me ajudaram a levantar quando tropecei...
Para as pessoas que fizeram a diferença em minha vida...
Para as pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades...
Para as pessoas que me aconselharam e me ajudaram a entender coisas
antes incompreensíveis...
Para as pessoas que abracei...
Para as pessoas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer
tudo o que sinto olhando nos olhos...
Para todas as pessoas essenciais na minha vida...

Dedico

Aos meus pais...
Que me deram a base de tudo que sou e sei hoje;
Que me passaram valores que perdurarão sempre.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e a capacidade de enxergar sempre o caminho a seguir;

À minha orientadora, querida professora Dra. Siu Mui Tsai, pela dedicação, estímulo constante e fonte de conhecimentos que me disponibilizou durante todo o trabalho;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela oportunidade de realizar esta pesquisa;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que gentilmente nos permitiu realizar a coleta dos urediniósporos da ferrugem do cafeeiro em suas instalações;

Aos pesquisadores do Instituto Biológico Dr. Ricardo Harakava e Dra. Sylvia Dias Guzzo pelo auxílio e orientação na aplicação dos instrumentos de pesquisa;

Ao Celso Bezerra de Jesus do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico que teve papel essencial na manutenção do experimento em sua primeira etapa;

Ao Francisco Carlos Montrazzi do laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA pelo cuidado com o experimento em sua segunda fase;

Ao Wagner Picinini pelo auxílio nas coletas dos urediniósporos da ferrugem do cafeeiro;

À Masako Toma Braghini, do Instituto Agrônomo de Campinas pela atenção e simpatia que sempre nos recebeu e pelo fornecimento das mudas e sementes de cafeeiro;

Ao Dr. Carlos Alberto Moldes e à Keyla Boralli pela grandiosa contribuição na elaboração e execução dos experimentos bioquímicos;

A todos do laboratório de Biologia Celular e Molecular que me acompanharam durante toda essa jornada;

Aos que participaram da banca de qualificação que auxiliaram com valiosas contribuições para a conclusão deste trabalho;

Àqueles que, mesmo não citados aqui, sabem que de forma direta ou indireta tiveram participação para que esta pesquisa se efetivasse.

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.

Continuamente vemos novidades,
Diferentes em tudo da esperança;
Do mal ficam as mágoas na lembrança,
E do bem, se algum houve, as saudades.

O tempo cobre o chão de verde manto,
Que já coberto foi de neve fria,
E enfim converte em choro o doce canto.

E, afora este mudar-se cada dia,
Outra mudança faz de mor espanto:
Que não se muda já como soía.

Luis Vaz de Camões

"O segredo da felicidade não é fazer sempre o que se quer, mas querer sempre o que se faz."

Leon Tolstói

RESUMO

Martinati, J.C. **Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício**. 2008. 113f. Tese (Doutorado) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

A maioria das plantas consegue defender-se contra infecções fúngicas por meios naturais, que podem ser induzidos por uma série de elicitores bióticos ou abióticos. O silício (Si) solúvel tem mostrado que é capaz de induzir resistência em várias espécies de plantas contra inúmeros patógenos. Neste trabalho foi proposta a avaliação dos compostos contendo Si na redução dos sintomas da ferrugem causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* em plantas de cafeeiros suscetíveis bem como avaliar os parâmetros bioquímicos envolvidos nos processos de resistência. Primeiramente, foram estudadas duas fontes de Si (silicato de Ca/Mg e silicato de potássio) em cinco doses para padronizar uma dose/fonte para os experimentos futuros. Foi possível observar que as plantas de cafeeiros não tiveram diferença significativa nos parâmetros de desenvolvimento como altura das plantas, área foliar, número de folhas para nenhuma das fontes e doses analisadas. Porém quando se tratava da contagem do número de lesões por cm², a fonte silicato de potássio na dose de 5mM conseguiu suprimir em até 60% o desenvolvimento das lesões causadas pelo fungo. Com a fonte e dose estabelecidas, o segundo passo do trabalho foi avaliar quais os processos bioquímicos envolvidos na resistência conferida pelo Si em plantas de cafeeiro. Foram analisadas as atividades das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (peroxidases guaiacol e ascorbato, catalases, e superóxido desmutases) e relacionadas à defesa (glucanase, quitinase e PAL). As folhas foram coletadas para a obtenção do extrato protéico em diferentes intervalos de tempo após a inoculação com o fungo: as 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação e como controle foi utilizado o tempo zero (sem inoculação). Nesta fase foi possível observar que a atividade das enzimas CAT, SOD, APX foi maior em plantas tratadas indicando que o Si parece estimular uma resposta mais rápida ao estresse oxidativo. O mesmo ocorreu com as enzimas relacionadas à defesa. A partir destes resultados podemos afirmar que o Si estimula uma resposta de defesa mais rápida em plantas de café suscetíveis à ferrugem quando inoculadas com o fungo patogênico.

Palavras chave: Silício, ferrugem, cafeeiro.

ABSTRACT

Martinati, J.C. **Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício**. 2008. 113f. Thesis (Doctoral) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

Most plants can defend themselves against fungal infections by natural means, which can be induced by a number of biotic and abiotic elicitors. Soluble silicon (Si) has been shown to induce resistance in a number of plant species against several pathogens. The objective of this work was to assess the influence of silicon application of symptoms caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* in susceptible coffee plants and evaluate the biochemistry process involved in defense mechanism. First of all, were studied two Si sources (Ca/Mg silicate and potassium silicate) in five doses to standardize dose/source for the future experiments. The statistical analysis showed that no difference was observed in relation to plant height, leaf area and number of leaves. However, the number of lesions reduced 60% in the higher silicon dose when compared to the number of lesions in control plants. Infected plants were found to have a linear decrease of lesions with the increase of silicate concentration. The lowest number of lesions per leaf area was observed in plants that received 5 μM of Si from potassium silicate. This result indicates the use of silicon as an alternative for an ecological management system for coffee disease protection. The second step of this work was to evaluate the biochemistry process involved in resistance induced by Si in susceptible coffee plants. The activity of the enzymes related to oxidative stress (peroxidases, catalase, and superoxide desmutase) and related to defense (glucanase, chitinase, PAL) was evaluated. The leaves were collected in different time intervals after the fungus inoculation (24, 48, 72 e 96 hours after the fungus inoculation) in order to obtain the protein extract. It was possible to observe that the activity of CAT, SOD and APX was higher in Si-treated coffee plants suggesting that Si could stimulate a faster response to oxidative stress. The same situation occurred to the defense related enzymes. By the results obtained here it is possible to verify that Si can stimulate a faster defense response in susceptible coffee plants when inoculated with coffee leaf rust fungus.

Keywords: Silicon, leaf rust, coffee plants.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 - Perfil de isoenzimas de SOD em folhas de cafeeiros suscetíveis à ferrugem (var. Mundo Novo).	74
Figura 2 - Perfil de isoenzimas de SOD em folhas de cafeeiros resistentes à ferrugem (var. Obatã).....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros.....	40
Gráfico 2. Representação gráfica da área foliar das plantas de cafeeiros.....	41
Gráfico 3. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros.....	42
Gráfico 4. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros.....	44
Gráfico 5. Atividade da CAT em folhas de cafeeiro Mundo Novo.....	67
Gráfico 6. Atividade da CAT em folhas de cafeeiro “Obatã”	67
Gráfico 7. Atividade da GPX em folhas de cafeeiro Mundo Novo.....	70
Gráfico 8. Atividade da GPX em folhas de cafeeiro “Obatã”	70
Gráfico 9. Atividade da APX em folhas de cafeeiro Mundo Novo.....	72
Gráfico 10. Atividade da APX em folhas de cafeeiro “Obatã”	72
Gráfico 11. Atividade da quitinase em folhas de cafeeiro Mundo Novo	79
Gráfico 12. Atividade da quitinase em folhas de cafeeiro Obatã	79
Gráfico 13. Atividade da glucanase em folhas de cafeeiro Mundo Novo.....	81
Gráfico 14. Atividade da glucanase em folhas de cafeeiro Obatã.....	81
Gráfico 15. Atividade da PAL em folhas de cafeeiro Mundo Novo	83
Gráfico 16. Atividade da PAL em folhas de cafeeiro Mundo Novo	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças controladas pelo Si em mono e dicotiledôneas.....	23
Tabela 1.1 - Resultado das análises de regressão linear para altura das plantas.....	40
Tabela 1.2 - Resultado das análises de regressão linear para área foliar (cm ²) das plantas de cafeeiro.	41
Tabela 1.3 - Resultado das análises de regressão linear para número de folhas das plantas de cafeeiro.	42
Tabela 1.4 - Resultado das análises de regressão linear para número de lesões/cm ² em folhas de cafeeiro.....	44
Tabela 1.5 Proteção conferida pelo Si em plantas de cafeeiros tratadas com diferentes fontes.....	45
Tabela 2.1 - Resultado das análises de regressão linear para o teor de silício em folhas de cafeeiro.	55
Tabela 2.3 - Teor médio (em %) de Si nas folhas de cafeeiro dos ensaios 1 e 2.....	56

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
II OBJETIVO GERAL DO TRABALHO	18
HIPÓTESES	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
III REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Considerações sobre a ferrugem do cafeeiro.	19
3.2 A ação do Si nas plantas.	20
3.3 Atividade do Si na ativação dos mecanismos de defesa.	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 1. EFEITO DO SILÍCIO NO CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E REDUÇÃO DOS SINTOMAS DA FERRUGEM EM PLANTAS DE CAFEEIRO.....	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
1 Produção de mudas de cafeeiro com o uso de silício:	37
2 Semeadura:.....	37
3 Tratamentos:	37
4 Obtenção do patógeno:	38
5 Inoculação do patógeno:	38
6 Avaliação da doença:	38
7 Análise do silício no crescimento das plantas de café:	38
8 Análises estatísticas:	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Análises dos parâmetros de desenvolvimento em plantas de cafeeiros.....	39
Redução dos sintomas da ferrugem em plantas de cafeeiros suscetíveis.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SI EM PLANTAS DE CAFEEIROS	52
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53

1 Determinação do teor de Si em plantas de cafeeiros.	53
2 Preparo das amostras para determinação de silício:	53
3 Determinação do silício:	53
4 Análises estatísticas:	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
A Teor de Si em plantas de cafeeiro obtidas a partir dos ensaios 1 e 2:.....	54
B Teor de Si em plantas de cafeeiros não inoculados mantidos em solução nutritiva: ..	56
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 3. BIOQUÍMICA DA INTERAÇÃO <i>Coffea arabica</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> -SI: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA E AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	60
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1 Semeadura:.....	61
2 Tratamento das plantas de cafeeiro:.....	62
3 Obtenção e inoculação do patógeno	62
4 Extração de proteínas:.....	62
5 Ensaio da catalase (CAT):	62
6 Ensaio da guaiacol peroxidase (GPX):	63
7 Ensaio da superóxido desmutase (SOD):.....	63
8 Ensaio da Ascorbato peroxidase (APX):	64
9 Atividade das quitinases:	64
10 Atividade das glucanases:.....	64
11 Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL):.....	65
12 Análises estatísticas:	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
A ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO	66
A1 Atividade da CAT	66
A2 Atividade da GPX	68
A3 Atividade da APX	71
B ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA.....	78

B1 Atividade da quitinase	78
B2 Atividade da glucanase.....	80
B3 Atividade da PAL	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A – Teores médios de silício(em %) nas folhas de cafeeiro.....	94
APÊNDICE B - Resultados das análises estatísticas para a atividade da catalase.....	94 <u>5</u>
APÊNDICE C - Resultados das análises estatísticas para a atividade da guaiacol peroxidase.....	98
APÊNDICE D - Resultados das análises estatísticas para a atividade da ascorbato peroxidase.....	101
APÊNDICE E - Resultados das análises estatísticas para a atividade da quitinase	104
APÊNDICE F - Resultados das análises estatísticas para a atividade da glucanase	107
APÊNDICE G - Resultados das análises estatísticas para a atividade da PAL.....	110
CONCLUSÕES FINAIS	113

I INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um dos mais importantes produtos da balança comercial brasileira, o café foi responsável pela entrada de divisas da ordem de US\$ 2.928.192 durante o ano de 2006 e US\$ 1.101.392 só até abril de 2007 (ABIC, 2007). O Brasil ocupa uma posição dominante no mercado mundial como principal produtor (contando com 2.410 milhões de hectares plantados com café) e como exportador. Estes dados mostram a importância da cultura do cafeeiro para a economia nacional. O potencial competitivo do país, no entanto, poderá crescer ainda mais com a redução de custos de produção através do aumento da produtividade.

Doenças e pragas constituem fatores restritivos para o alcance de uma produção ideal. Entre outras está a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berkeley et Broome. Atualmente, a ferrugem atinge todas as regiões cafeeicultoras do Brasil e, se não for devidamente controlada, pode causar queda na produção de até 45% (MATIELLO, 1991). O controle químico da ferrugem tem se mostrado eficiente porém, além de representar de 10 a 20% do custo total da produção (MATIELLO, 1991), pode aumentar a gravidade de outras pragas e doenças devido seu efeito na microbiota de eliminar inimigos naturais (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002). Outro agravante do uso de controle químico de pragas e doenças seria seu alto potencial de causar danos ao meio ambiente e aos trabalhadores rurais. Um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos de controle de pragas e doenças eficientes, econômicos e de baixo impacto ambiental.

A utilização de métodos biológicos ou outros métodos profiláticos como estratégias alternativas de manejo de controle de doenças tem despertado bastante interesse, principalmente pelo potencial de uso comercial. O uso de cultivares melhoradas geneticamente constitui um atrativo para este problema, uma vez que, reduz a utilização de agrotóxicos. Existe ainda a perspectiva promissora do controle da doença pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, através da aplicação prévia à inoculação do patógeno, de produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência (MARTINS, 1991; MORAES, 1992). Tem sido demonstrado ainda, que a indução de resistência em plantas suscetíveis confere proteção quantitativa contra uma ampla gama de microrganismos, através da ativação dos mecanismos de resistência das plantas, associada à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa.

A descoberta do uso do Si como um composto capaz de suavizar os sintomas de doenças em plantas desperta o interesse pelo seu uso no controle de doenças. Aliado a este fato o Si parece não influenciar diretamente os patógenos, não sendo considerado um fungicida e, portanto não causa por pressão de seleção a triagem de linhagens mais resistentes. Através do uso de uma fonte rica de silicato prontamente disponível (ex. palhada de gramíneas) ou via fornecimento ao solo ou folha, o Si contribui para o aumento do grau de supressão a patógenos, podendo aumentar significativamente a produção e a qualidade o que torna seu uso viável do ponto de vista técnico e ecológico.

Alguns dos mecanismos de resistência à doenças conferidos pelo Si, seria pela associação deste com constituintes da parede celular, tornando-as menos acessíveis as enzimas de degradação, e também pelo aumento da atividade de enzimas relacionadas à defesa (quitinases, glucanases, etc.). Estudos sobre ativação dos mecanismos de defesa já foram realizados em cafeeiros suscetíveis a ferrugem com resultados promissores indicando que, mesmo uma cultivar com propensão à doença é capaz de responder aos estímulos dos indutores fazendo com que a doença não se estabeleça (GUZZO; MARTINS, 1996; GUZZO, 2004; BOTELHO et al., 2005)

O desenvolvimento de tecnologias e/ou metodologias para um manejo sustentável depende da expansão de pesquisas que viabilizem os métodos alternativos de controle. Com isso tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre o modo de ação destes compostos analisando com mais particularidade os mecanismos de defesa das plantas envolvidos no processo de redução da doença.

II OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

HIPÓTESES

Para que novas tecnologias e/ou metodologias de manejo sustentável sejam desenvolvidas e utilizadas, torna-se necessário que os novos métodos de controle propostos citados sejam viáveis. A funcionalidade dos compostos chamados “indutores de resistência” pode ser explicada e confirmada muitas vezes através das mudanças fisiológicas e bioquímicas que estes provocam nas plantas suscetíveis tornando-as aptas a eliminar o patógeno e conseqüentemente evitar a doença.

Algumas das primeiras mudanças que ocorrem como mecanismo de defesa são o aumento de atividade de algumas enzimas. As respostas de hipersensibilidade são os primeiros eventos que ocorrem nas células das plantas em resposta à estresses bióticos e abióticos. Há síntese de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 , OH e O_2^- que podem produzir danos oxidativos nos seres vivos como forma de proteção. Algumas enzimas fazem o papel de remover ou neutralizar estes compostos reativos neutralizando assim a célula dos danos por eles causados. Outras enzimas como glucanases e quitinases e fenilalanina amônia-liase (PAL) participam de uma fase um pouco mais tardia da resposta de defesa e são sintetizadas a fim de degradar a parede celular do patógeno agressor. Muitas outras proteínas estão envolvidas no processo de defesa contra patógenos, cada uma exercendo uma função para que a tarefa seja realizada com sucesso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em vista das hipóteses apresentadas, este trabalho teve por objetivo:

- Avaliar o potencial do Si no controle e redução dos sintomas causados pelo *Hemileia vastatrix* em plantas de cafeeiro;
- Através de ensaios bioquímicos enzimáticos, verificar a atividade das enzimas quitinase, glucanase, PAL, catalase, peroxidases (ascorbato e guaiacol), superóxido desmutase em cafeeiros suscetíveis e resistentes ao *H. vastatrix* pela aplicação de Si;
- Comparar as respostas obtidas em plantas de cafeeiros suscetíveis e resistentes visando identificar mecanismos bioquímicos de resistência envolvidos na proteção contra o *H. vastatrix*.

III REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Considerações sobre a ferrugem do cafeeiro.

Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem é a mais importante, por causar grandes prejuízos para a cafeicultura (MENDES; GUIMARÃES, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997). Ela ocorre em todas as regiões produtoras de café no Brasil e na América Central. O agente da doença é o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. e atualmente, existem mais de quarenta raças fisiológicas de ferrugem, que atacam os cafeeiros, sendo que no Brasil são encontradas cerca de oito raças virulentas. Entre estas, a raça II predomina nos cafeeiros brasileiros. O fungo ataca todas as variedades de café, porém, dentro do gênero *Coffea canephora* algumas das cultivares apresentam resistência, enquanto que a maioria das cultivares comerciais dentro da espécie *Coffea arabica* é suscetível. Os danos causados pela ferrugem são, principalmente indiretos, pela indução de desfolha por ocasião da colheita. A queda precoce das folhas resulta em uma menor intensidade da florada, e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos em mais de 50%, a produção do cafeeiro (GREE, 1993; ZAMBOLIM et al., 1997). Os primeiros sintomas da enfermidade são pequenas manchas circulares de cor amarelo laranja, com diâmetro de 0,5 cm que se apresentam na face inferior da folha. Sobre a mancha forma-se uma massa pulverulenta de urediniósporos. No estágio mais avançados, algumas partes do tecido foliar são destruídas e necrosadas. Os sintomas ocorrem principalmente nas folhas onde se formam manchas amareladas, de 1 a 3 mm e formato circular na parte superior das folhas. Pústulas de 0,5 a 2 cm com uma intensa esporulação de cor alaranjada e aspecto ferruginoso são observadas na face abaxial das folhas. A doença também pode ser observada em frutos verdes e extremidades de ramos e brotações. Os sintomas surgem geralmente de dezembro a janeiro e tem seu pico entre abril a maio. O efeito mais prejudicial é a desfolha acentuada sob condições de alta severidade da doença.

A ocorrência da doença é favorecida por fatores ligados aos hospedeiros (cafeeiro), ao patógeno (fungo) e relacionados com o ambiente. Entre os fatores relacionados com a planta e com o ambiente, que permitem inferir sobre a ocorrência e a intensidade do ataque, estão: o enfolhamento, a carga pendente (produção) e a densidade de planta. Esses fatores são importantes na hora de definir o controle da doença. Condições climáticas favoráveis à doença são temperaturas entre 20 e 24°C, molhamento foliar e chuvas constantes. A doença ainda é favorecida em cafezais cultivados em locais com altitude entre 800 a 1300 metros e com adubação inadequada. A disseminação dos urediniósporos ocorre pelo vento e

respingos de chuva. A luz inibe a germinação e o crescimento do tubo germinativo, sendo a penetração do fungo através dos estômatos da planta. O fungo coloniza o tecido intercelularmente e os esporos são formados e liberados de pústulas na face abaxial das folhas.

3.2 - A ação do Si nas plantas.

Apesar do Si não ser considerado um nutriente essencial para a maioria das plantas, seu efeito benéfico é reconhecido em muitas delas e seu potencial benéfico tem sido extensivamente estudado. Seu papel nas plantas é reconhecido por aliviar os estresses bióticos e abióticos sendo este mecanismo traduzido na diminuição da expressão de enzimas do estresse oxidativo. Este é o único elemento que confere resistência às plantas a múltiplos fatores de estresse (EPSTEIN, 1999) e também é considerado o único elemento que não causa danos às plantas quando acumulado em excesso. No entanto Epstein e Bloom (2005) modificaram as definições sobre a essencialidade dos elementos estabelecida por Arnon e Stout (1939). Baseados na nova definição, um elemento é essencial quando preenche um, ou os dois critérios citados: (1) O elemento é parte da molécula cujo componente é intrínseco à estrutura ou metabolismo da planta e (2) a planta, quando deficiente neste elemento apresenta anormalidades no crescimento, desenvolvimento ou reprodução.

Em plantas de arroz, utilizando a técnica de ressonância nuclear magnética, foi possível identificar que a forma de Si translocado através do xilema é o ácido monossilícico cuja concentração no xilema é transitoriamente alta (MITANI et al., 2005) e sua distribuição não é uniforme nas diferentes partes da planta. Muito do Si encontrado nas plantas é polimerizado como $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e pode ser encontrado na parede celular, lúmen das células, espaços intercelulares (SANGSTER; HOSDON; TUBB, 2001). Entretanto quantidades consideráveis de Si podem ser encontradas em compostos orgânicos porque se liga à proteínas, lipídeos, fenóis e polissacarídeos (FAUTEUX et al., 2005). Geralmente o Si é depositado em grandes quantidades nos tecidos onde a perda de água é maior sendo este fato outrora ligado de modo indireto ao transporte passivo deste elemento. No entanto, muitos estudos indicam a presença de um sistema de transporte ativo para o Si em raízes de plantas de arroz envolvendo proteínas transportadoras de membrana. (MA et al., 2004; RAVEN, 2001). Outro trabalho onde a hipótese do transporte passivo do Si é contestada mostra que em plantas de pepino o teor de Si absorvido é duas vezes maior que a taxa de

transpiração, assumindo assim pouca ligação entre os mecanismos de transpiração e absorção (LIANG; SI; ROMHELD, 2005).

Baseado em trabalhos sobre a proporção de Si por peso seco das plantas, Miyake e Takahashi (1985) caracterizaram as plantas em três tipos, quanto à absorção de Si: 1 - Acumuladoras, com um teor bastante elevado de Si (>1%) 2 - Não Acumuladoras, caracterizando-se por um baixo teor do elemento (<1%); 3 - Intermediárias, as quais apresentam uma quantidade considerável de Si (entre 0,5% e 1%). Postula-se a essencialidade agrônômica do Si, principalmente em plantas acumuladoras, em vista dos diversos benefícios advindos com a nutrição deste elemento. O Si pode estimular o crescimento e a produção vegetal através de várias ações indiretas, como o aumento no teor de clorofila; maior massa foliar (fresca e seca) específica; atraso na senescência; decréscimo na suscetibilidade ao acamamento; maior rigidez estrutural dos tecidos; proteção contra estresses bióticos e abióticos, como a redução da toxidez de Al, Mn, Fe, Cd, B e Na; interações positivas com fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos; aumento na proteção contra herbívoros, incluindo os insetos fitófagos e principalmente, diminuição na incidência de inúmeros fungos patogênicos (EPSTEIN, 1994; MARSCHNER, 1995; SAVANT; SNYDEL; DATNOFF, 1997).

A melhor arquitetura foliar permite maior penetração de luz solar, maior absorção de CO₂ e diminuição da transpiração excessiva, o que permite o incremento da taxa fotossintética (TAKAHASHI, 1995). Constatou-se, em plantas de arroz, que a suplementação de Si proporciona um aumento na produção e na massa individual das sementes, diminuição da esterilidade e do teor de Mn, e maior taxa fotossintética (MATOH; MURATA; TAHASHI, 1991; PERSHIN; PERSHINA; EGORINA, 1995). Em condições de estresse hídrico o Si pode induzir aumento na atividade da superóxido dismutase e deste modo diminuindo o estresse, interfere na capacidade fotossintética, no conteúdo de clorofila e na massa radicular (SCHIMIDT et al., 1999). O Si pode influenciar o movimento estomatal em resposta aos estímulos do ambiente, ao regular o potencial hídrico nas células epidérmicas (AGARIE et al., 1998).

Muitas plantas de culturas importantes são reconhecidas como não acumuladoras e são incapazes de transportar Si através das raízes, mesmo quando a concentração deste elemento no solo é alta e, portanto falham em acumular grandes quantidades de Si na parte aérea. Nessas plantas o Si desempenharia um papel indireto agindo sobre a atividade de

enzimas degradadoras de espécies reativas de oxigênio, e também enzimas degradadoras de parede celular de patógenos.

Uma particularidade do ácido monossilícico (forma absorvida pela planta), é que este pode formar complexos estáveis com as hidroxilas orgânicas presente em resíduos de aminoácidos (INGRI, 1978). Desta forma, uma das hipóteses sugeridas seria de que o Si, ligado ao grupo hidroxila de proteínas quinases, seria o responsável pelas alterações de atividade ou conformação desta proteína que é responsável pelo transporte de informações ao núcleo através da fosforilação desses grupos hidroxilas (FAUTEUX et al., 2005). Informações filogenéticas sobre a variação do Si na parte aérea de plantas podem elucidar os mecanismos genéticos e moleculares da absorção e transporte de Si nas plantas (HODSON et al., 2005).

No entanto, os estudos com Si estão caminhando para uma melhor compreensão dos seus efeitos e mecanismos em plantas. Quanto mais estudos são feitos sobre a importância do Si na fisiologia das plantas, mais são encontradas diversas maneiras do uso deste importante elemento para melhorar a vitalidade das plantas e a resistência a doenças.

3.3 - Atividade do Si na ativação dos mecanismos de defesa.

A proteção natural das plantas contra patógenos está baseada em dois tipos de resistência. A primeira, denominada resistência constitutiva, é aquela relacionada às barreiras de defesa químicas e físicas presentes antes do ataque do microorganismo patogênico ou praga. Quando a planta ativa o mecanismo de defesa após o contato com o patógeno potencial, a resistência é denominada induzida ou adquirida (STICHER; MAUCHI-MANI; METRAUX; 1997). A resistência sistêmica adquirida (SAR) implica na produção de um sinal a partir do local inicial de penetração do patógeno, ou do local de aplicação do indutor, e sua posterior translocação para outras partes da planta, impedindo uma infecção posterior do patógeno (MADAMANCHI; KUC, 1991).

Embora sejam geneticamente controladas, a resistência e a tolerância das plantas são bastante influenciadas por fatores ambientais. A nutrição mineral da planta pode ser considerada como um fator ambiental que pode ser manipulado de modo relativamente fácil, tornando-se um componente importante de controle das doenças (MARSCHNER, 1995).

Neste aspecto, muitos trabalhos mostram o Si como um fator que influencia o grau de suscetibilidade/resistência de plantas ao ataque de fungos. A associação Si - monocotiledôneas e a redução de doenças fúngicas é conhecida há bastante tempo. Seu efeito inibidor em doenças fúngicas, porém, não é restrito somente a um grupo de planta. Outras espécies como pepineiro (CHÉRIF et al., 1992), videira (BOWEN et al., 1992), soja (GROETHE-LIMA, 1998) entre outras, apresentam o controle de diferentes doenças pelo Si. A Tabela 1 mostra exemplos significativos de redução na incidência de doenças de mono e dicotiledôneas.

Tabela 1 - Doenças controladas pelo Si em mono e dicotiledôneas.

Cultura	Patógeno	Referência
Cana-de-açúcar	<i>Puccinia melanocephala e Leptosphaeria sacchari</i>	Fox; Silva, 1978; Raid, Anderson; Ulloa, 1992.
Arroz	<i>Pyricularia oryzae, Bipolaris oryzae, Corticium sasakii, Rhizoctonia solani, Helminthosporium oryzae, Gerlachia oryzae; Magnaphorte grisea</i>	Datnoff et al., 1990, 1991; Osuna-Canizales; Dedatta; Bonman, 1991; Mathai; Paily; Menon, 1978; Wang et al., 1994; Winslow, 1992; Rodrigues et al., 2003.
Sorgo	<i>Colletotricum graminocolum; Striga asiatica e Rhizoctonia solani</i>	Narwal, 1973; Maiti et al., 1984 e Wu; Hsieh, 1990.
Cevada	<i>Erysiphe graminis</i>	Jiang; Zeyen; Russo, 1989.
Trigo	<i>Erysiphe graminis</i>	Leusch; Buchenauer, 1989.
Pepineiro	<i>Sphaerotheca fuliginea, Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Botrytis cinerea, Didymella bryoniae</i>	Adatia; Besford, 1986; Menzies et al., 1991, 1992; Chérif et al., 1992; O'Neill, 1991; Voogt, 1990.
Aboboreira	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Adatia; Besford, 1986; Menzies et al., 1991; Guo et al., 2007.
Meloeiro	<i>Trichothecium roseo</i>	
Videira	<i>Uncinula necator</i>	Bowen et al., 1992.
Roseira	<i>Sphaerotheca pannosa, Peronospora sparsa</i>	Voogt, 1992.
Limão	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Faggiani, 2002
Tabaco	<i>Xylella fastidiosa</i>	Martinati et al., 2007
Cafeiro	<i>Cercospora coffeicola, Hemileia vastatrix</i>	Botelho et al., 2005; Santos, 2002; Pozza 2004; Amaral, 2005; Nojosa, 2003, Martinati et al., 2008 ¹ .
Feijão	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Moraes et al., 2006,
Soja	<i>Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis</i>	Grothge-Lima, 1998.

¹MARTINATI, J. C. et al. The potential use of a silicon source as a component of an ecological management of coffee plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2008. (no prelo)

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Laboratório do CENA-USP sobre o papel do Si em plantas. Constatou-se que o fornecimento do Si através da solução nutritiva aumenta a resistência da soja ao cancro da haste onde a extensão da lesão, provocada pelo fungo na medula dessas plantas, diminuiu em até 90% (GROETHE-LIMA et al., 1998; LIMA FILHO; GROETHE-LIMA; TSAI, 1998). Resultados semelhantes também foram constatados nas interações *Nicotiana tabacum* -*Xylella fastidiosa* (MARTINATI et al., 2007), *Citrus jambhiri*-*Phytophthora nicotianae* (FAGGIANI, 2002), em plantas de trigo e feijão.

A primeira referência estudando do modo de ação do Si sobre a redução da severidade de uma doença data de 1940. Foi observada uma relação direta entre a deposição de ácido silícico nos sítios de infecção de oídio e o grau de resistência da planta. Houve uma silicificação das células epidérmicas, inferindo-se que a penetração do tubo infectivo foi impedida pelo Si, agindo assim como uma barreira física. Deste modo, uma menor porcentagem de esporos, germinando na epiderme foliar, obteve sucesso na penetração e posterior colonização (WAGNER, 1940). Barreiras mecânicas incluem mudanças na anatomia, como células epidérmicas mais grossas e um grau maior de lignificação e/ou silicificação podendo ser considerados como uma barreira física efetiva na penetração da hifa (EPSTEIN, 1994; MARSCHNER, 1995). Deste modo, o papel do Si incorporado à parede celular é análogo ao da lignina, que é um componente estrutural resistente à compressão. A incorporação do Si tem pelo menos dois efeitos positivos do ponto de vista energético: O seu custo é 3,7% daquele relativo à incorporação da lignina; melhora da interceptação da luz solar, portanto da fotossíntese, devido à melhor arquitetura das plantas supridas com uma grande quantidade de Si (RAVEN, 1983). Observações ultraestruturais sugerem que a silicificação das paredes celulares pode reduzir a troca de material entre patógeno e hospedeiro, reduzindo a senescência prematura, além de agir como barreira física, caso o fungo alcance a parede celular (HEATH; STUMPF, 1986). Outras hipóteses dizem respeito ao papel do Si na disponibilidade de nutrientes para o crescimento dos patógenos. Takashi (1995) considerou que o Si poderia conferir maior resistência às plantas de arroz pelo fato de interagir com a nutrição nitrogenada ao promover a assimilação do amônio que não permite que fique nitrogênio solúvel disponível para ser usado pelo fungo em sua propagação.

Entretanto, a barreira física proporcionada pelo Si nas células epidérmicas não é o único mecanismo de combate à penetração das hifas de fungos ou ataque de insetos. O Si também age no tecido hospedeiro resultando em uma ativação mais rápida e extensiva dos

mecanismos de defesa da planta (SAMUELS et al., 1991; CHÉRIF et al., 1992a, 1992b, 1994). Uma produção mais rápida de fitoalexinas foi observada em folhas de pepino infectado com *Cladosporium cucumerinum* e tratadas com Si quando comparadas com as plantas controles (FAWE et al., 1998). Outros tipos de resposta observados, também em pepinos infectados com *Pythium aphanidermatum* foram a estimulação da atividade de quitinas e uma ativação mais intensa e rápida das peroxidases e das polifenoloxidasas pós-infecção (CHÉRIF et al., 1994).

Compostos fenólicos e Si se acumulam nos sítios de infecção, cuja causa ainda não está esclarecida. Utilizando técnicas citoquímicas observou-se um aumento significativo de depósitos de compostos fenólicos em células epidérmicas infectadas tratadas com Si, que se acumulam ao longo da parede celular e na membrana (BÉLANGER et al., 2003). O Si pode formar complexos com os compostos fenólicos e elevar a síntese e mobilidade destes no apoplasto. Uma rápida deposição de compostos fenólicos ou lignina nos sítios de infecção é um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos, e a presença de Si solúvel facilita este mecanismo de resistência (MENZIES et al., 1991). Koga et al. (1988) estabeleceram uma hipótese relativa que o Si e compostos fenólicos são liberados pela descompartimentalização que se segue após a morte da célula, acumulando-se nas paredes das células mortas.

Existe ainda uma relação inversa bastante significativa entre a intensidade da luz e o conteúdo de fenóis em folhas. Portanto, alguns mecanismos de defesa da planta, como aqueles baseados no metabolismo dos compostos fenólicos, ficam enfraquecidos no período noturno. Aventa-se a possibilidade do aumento da capacidade destes mecanismos no escuro, quando a planta é suprida com quantidades elevadas de Si (MARSCHNER, 1995). Carver et al. (1994) observaram que, na presença de luz contínua, ocorre um atraso na formação do haustório de *E. graminis* f. sp. *avenae* em folhas de aveia. Trinta horas após a inoculação, em ausência constante de luz, o conteúdo de Si das paredes celulares do hospedeiro é substancialmente aumentado, diminuindo a penetração do fungo nas células tratadas. O mesmo efeito não foi observado no tratamento com luz.

A resistência induzida pelo Si apresenta similaridades com a SAR. Em ambos os casos, o potencial de defesa da planta aumenta e é maximizado após a infecção. A bioatividade do Si é comparada com os mensageiros secundários ativadores da SAR onde ele agiria como um modulador que poderia influenciar o tempo das respostas de defesa (FAWE et al., 2001). Entretanto, a resistência induzida pelo Si é rapidamente perdida

quando este nutriente é removido do meio, enquanto que a SAR é caracterizada pelo efeito durável (FAWE et al., 1998). Essa diferença no efeito protetor do Si em relação à SAR pode ser resultado das propriedades do Si dentro da planta, requerido na forma solúvel, mas apresenta-se na forma polimerizada dentro da planta.

Mas a indução de mecanismos de defesa através da ação de elicitores antes de ocorrer a infecção desvia o metabolismo energético de seu padrão normal, podendo resultar em perdas na produção. Em contrapartida, a fertilização com Si parece induzir o mecanismo de defesa somente em resposta ao ataque do patógeno. Esta indução é expressa através de uma reação em cadeia de várias mudanças bioquímicas associadas, caracterizando uma resposta de defesa rápida e prolongada. Esta característica explica a não especificidade da resistência induzida pelo Si, em vários patógenos não relacionados (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER 1994). Analisando plantas de *Arabidopsis* tratadas ou não com Si e inoculadas com *Erysiphe cichoracearum* através de microarrays, Fauteux et al. (2006) observaram que houve diferenças no padrão de expressão de aproximadamente 4000 genes, enquanto que em plantas, tratadas ou não, porém não inoculadas esta alteração foi nula.

As primeiras evidências do aumento na expressão dos mecanismos de defesa pelo efeito do Si foi relatado em plantas de *C. sativus* infectadas com *Pythium ultimum* e *Pythium aphanidermatum*. Ocorreu alta atividade fungistática, com ativação rápida e intensa de peroxidases, polifenoloxidasas e quitinases, além de aumento na atividade da enzima beta-glicosidase, a qual apresenta correlação com a presença de gliconas fungitóxicas encontradas nas raízes das plantas, e com a eficácia destas em suprimir o *Pythium* sp (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER 1994). A interação *Cucumis sativa* e *Sphaerotheca fuliginea* é o modelo mais utilizado para o estudo da ligação entre o Si e a expressão das reações de defesa em plantas.

Enzimas com função de degradar espécies ativas de oxigênio também tiveram sua atividade modificada na presença de Si. A atividade da superóxido desmutase, peroxidase e catalase aumentou significativamente na presença de Si exógeno em raízes de plantas de arroz submetidas ao estresse salino quando comparadas às plantas controle (LIANG et al., 2003). Em plantas de trigo na presença do oídio, a atividade destas mesmas enzimas foi testada e com o aumento da dose de Si, a atividade diminui e aumentam a síntese de compostos fenólicos (LIMA FILHO et al., 2005). Esses resultados mostram que a plantas, quando suplementadas com Si respondem diferentemente aos distintos estímulos a que são

submetidas além de revelar o potencial do Si não apenas como uma barreira física, mas também como um mecanismo bioquímico de defesa.

Recentemente, técnicas mais avançadas permitiram o estudo em larga escala da expressão de genes induzidos pelo Si em plantas de *Arabidopsis* inoculadas com o fungo patogênico *Erysiphe cichoracearum* DC. Muitos dos genes induzidos pelo Si em plantas inoculadas foi categorizado como sendo relacionados à defesa enquanto que a maioria dos genes reprimidos estava envolvida no metabolismo primário. Os genes relacionados à defesa incluem os genes R, fatores de transcrição relacionados ao estresse, genes envolvidos na transdução de sinais, genes envolvidos na biossíntese de hormônios como ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno, e relacionados ao metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Nas plantas inoculadas tratadas com Si a magnitude dos genes que foram reprimidos foi atenuada em 25% indicando que houve diminuição do estresse.

Nesta nova era tecnológica onde cada vez mais as metodologias comportam o estudo mais detalhado dos perfis de expressão gênica, seu uso permite uma conclusão dos mais diversos mecanismos na fisiologia, bioquímica, genética das plantas e vários outros organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC. Disponível em: <http://abic.com.br>. Acesso em outubro 2007.

ADATIA, M. H.; BESFORD, R. T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 58, p. 343-351, 1986.

AGARIE, S. et al. Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Plant Production Science**, Tokyo, v. 1, n. 2, p. 89-95, 1998.

AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiros contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ARNON, D. I.; STOUT, P. R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to cooper. **Plant Physiology**, Rockville, v. 14, p. 371-375, 1939.

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**, St. Paul, v. 93, n. 4, p. 402-412, 2003.

BOTELHO, D. M. S. et al. Effect of silicon doses and sources on the intensity of the brown eye spot of coffee seedlings. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, 2005.

BOWEN, P. et al. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 117, p. 906-912, 1992.

CARVER, T. L. W. et al. Light-mediated delay of primary haustorium formation by *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, p. 59-79, 1994.

CHÉRIF, M. et al. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 411-425, 1992a.

CHÉRIF, M. et al. Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 371-385, 1992b.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 236-242, 1994.

CHÉRIF, M. et al. Yield of cucumber infected with *Pythium aphanidermatum* when grown with soluble silicon. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 896-897, 1994.

DATNOFF, L. E. et al. Evaluation of calcium silicate slag and nitrogen on brown spot, neck rot, and sheath blight development on rice. **Biological and Cultural Tests for Control of Plant Disease**, St. Paul, v. 5, p. 65, 1990.

DATNOFF, L. E. et al. Effect of calcium on blast and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 7, p. 729-732, 1991.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 11-17, 1994.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives**. 2. ed. Sunderland: Sinauer, 2005.

FAGGIANI, E. P. **O silício na defesa do limão rugoso (*Citrus jambhiri*) a *Phytophthora nicotianae* pv. *parasitica***. 2002. 236 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

FAUTEUX, F. et al. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FAUTEUX, F. et al. The protective role of silicon in the *Arabidopsis* – powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.

FAWE, A. et al. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 88, n. 5, p. 396-401, 1998.

FAWE, A. et al. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 2001. p. 159-169.

FOX, R. L.; SILVA, J. A. Symptoms of plant malnutrition: silicon, and agronomically essential nutrient for sugarcane. In: ILLUSTRATED concepts in tropical agriculture. Honolulu: Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, 1978.

GROTHGE-LIMA, M. T. **Interrelação cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis*), nodulação (*Bradyrhizobium japonicum*) e silício em soja [*Glycine max (L.) merrill*]**. 1998. 58 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

GREE, G. Epidemiology of coffee leaf rust in the Eastern Highlands. **Newsletter - Coffee Research Institute**, Chickmagalur, n. 2, p. 16-20, 1993.

GUO, Y. et al. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.) **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, p. 1012-1018, 2007.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1-3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 449-454, 1996.

HEATH, M. C.; STUMPF, M. A. Ultrastructural observations of penetration sites of the cowpea rust fungus in untreated and silicon depleted French bean cells. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, n. 1, p. 27-39, 1986.

HODSON, M. J. et al. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 6, p. 1027-1046, 2005.

INGRI, N. Aqueous silicic acid, silicates and silicate complex In: BENDZ, G.; LINDQUIST, I. (Ed.). **Biochemistry of silicon and related problems**. New York: Plenum, 1978. p. 3-50.

JIANG, D.; ZEYEN, R. J.; RUSSO, V. Silicon enhances resistance of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 1198, 1989. Supplement.

KOGA, H. et al. Hypersensitive cell death, autofluorescence and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, n. 3, p. 395-409, 1988.

LEUSCH, H. J.; BUCHENAUER, H. Effect of soil treatments with silica-rich lime fertilizers and sodium trisilicate on the incidence of wheat by *Erysiphe graminis* and *Septoria nodorum* depending on the form of N-fertilizer. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 96, p. 154-172, 1989.

LIANG, Y. et al. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1157-1165, 2003.

LIANG, Y.; SI, J.; ROMHELD, V. Silicon uptake transport is an active process in cucumber. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 106.

LIMA FILHO, O. F.; GROTHGE-LIMA, M. T; TSAI, S. M. Interrelação silício, nodulação (*Bradyrhizobium japonicum*) e cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis*) em duas cultivares de soja. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., 1998, Caxambu. **Resumos Expandidos...** Caxambu: SBCS; SBM; UFLA, 1998. p. 134.

LIMA-FILHO, O. F. et al. Biochemical responses of wheat under oidium attack in the presence of silicon under hydroponic conditions. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 142.

MA, J. F. et al. Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon transporter gene in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 2, p. 3284-3289, 2004.

MADAMANCHI, N. R.; KUC, J. Induced systemic resistance in plants. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 347-362.

MAITI, R. K. et al. A comparative study of the haustorial development of *Striga asiatica* (L.) Kuntze on *Sorghum* cultivars. **Annals of Botany**, Oxford, v. 54, p. 447-457, 1984.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995. 887 p.

MARTINATI, J. C. et al. Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* por meio de aplicação de benzotiadiazole e silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1083-1089, 2007.

MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPDA, 1991. cap. 24, p. 345-363.

MATHAI, G.; PAIFY, P. V.; MENON, M. R. Effect of fungicides and silica in the control of sheath blight disease of rice caused by *Corticium sasakii* (Shiriai). **Agricultural Research Journal of Kerala**, Trichur, v. 19, p. 79-83, 1978.

MATIELLO, J. B. **O café: Do cultivo ao consumo**. São Paulo: Editora Globo, 1991.

MATIELLO, J. B. et al. Podas. In: _____. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. p. 256-274.

MATOH, T.; MURATA, S.; TAKAHASHI, E. Effect of silicate application on photosynthesis of rice plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 248-251, 1991.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, A. F. **Economia cafeeira: o agribusiness**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997.

MENZIES, J. G. et al. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 84-88, 1991.

MENZIES, J. G. et al. Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 117, n. 6, p. 902-905, 1992.

MITANI, N. et al. Characterization of silicon uptake system and isolation of *LS11* gene from rice root. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 124.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth of soybean plants in a solution culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 31, p. 625-636, 1985.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.

MORAES, S. R. G. et al. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2006.

NARWAL, R. P. Silica bodies and resistance to infection in jowar (*Sorghum vulgare* Perc.). **Agra University Journal Research**, Agra, v. 22, p. 17-20, 1973.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito dos indutores na resistência de *Coffea arábica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. E *Phoma costarricensis* ECHANDI.** 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

O'NEILL, T. M. Investigations of glasshouse structure, growing medium and silicon nutrition as factors affecting disease incidence in cucumber crops. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent**, Gent, v. 56, n. 2b, p. 359-367, 1991.

OSUNA-CANIZALES, F. J.; DEDATTA, S. K.; BONMAN, J. M. Nitrogen form and silicon nutrition effects on resistance to bruzone disease of rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 135, p. 223-231, 1991.

PERSHIN, B. M.; PERSHINA, A. N.; EGORINA, L. M. Silicon and rice production in the Primorskii region. **Agrokhimiya**, Moscow, v. 10, p. 68-74, 1995.

POZZA, A. A. A. **Silício em mudas de cafeeiro: efeito na nutrição mineral e na suscetibilidade à cercosporiose em três variedades**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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 sugar cane. **Crop Protection**, Guildford, v. 11, n. 1, p. 84-88, 1992.

RAVEN, J. A. The transport and function of silicon in plants. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 58, p. 179-207, 1983.

RAVEN, J. A. Silicon transport at the cell and tissue level. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 2001. p. 41-55.

RODRIGUES, F. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 535-546, 2003.

RODRIGUES, F. A. et al. Effect of foliar application of potassium silicate on angular leaf spot development on beans. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 105.

SAMUELS, A. L. et al. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 14, p. 485-492, 1991.

SANGSTER, A. G.; HODSON, M. J.; TUBB, H. J. Silicon deposition in higher plants. In: DATNOFF, G. H.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 2001. p. 85-114.

SANTOS, D. M. **Efeito do silício na intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke) em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2002. 43 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SAVANT, N. K.; SNYDER, G. H.; DATNOFF, L. E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, New York, v. 58, p. 151-199, 1997.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TAKAHASHI, E. Uptake mode and physiological functions of silica. In: MATSUO, T. et al. (Ed.). **Science of the rice plant: physiology**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1995. cap. 5, p. 420-433.

VOOGT, W. Si application on grown cucumber. In: GLASSHOUSE CROPS RESEARCH STATION. **Annual Report 1990**. Naaldwijk, 1990. p. 13-14.

VOOGT, W. The effects of Si application on roses in rockwool. In: GLASSHOUSE CROPS RESEARCH STATION. **Annual Report 1992**. Naaldwijk, 1992. p. 17-18.

WAGNER, F. Die bedeutung der kieselsäure für das wachstum einiger kulturpflanzen, ihren nährstoffhaushalt und ihre anfälligkeit gegen echte mehltäupilze. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 12, p. 427-479, 1940.

WANG, Q. S. et al. Yield response of rice to silica fertilizer. **Soils**, Norcross, v. 26, n. 2, p. 92-94, 1994.

WINSLOW, M. D. Silicon, disease resistance and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 1208-1213, 1992.

WU, W. S.; HSIEH, T. F. The effect of nutrient condition on *Rhizoctonia solani* Kuhn AG-1 caused sorghum sheath blight. **Plant Protection Bulletin Taipei**, Taipei, v. 32, n. 4, p. 265-276, 1990.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 1997. p. 83-180.

ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2002. p. 369-433.

CAPÍTULO 1. EFEITO DO SILÍCIO NO CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E REDUÇÃO DOS SINTOMAS DA FERRUGEM EM PLANTAS DE CAFEIEIRO.

INTRODUÇÃO

Coffea arabica é um dos principais produtos agrícolas exportados nos países em desenvolvimento. Esta cultura perene está propensa a grandes perdas na produção devido a pestes e doenças. A doença mais agressiva do cafeeiro é a ferrugem alaranjada do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berkeley et Brome que chega a causar perdas estimadas em até 45% da produção se métodos de controle não forem tomados (MATIELLO, 1991).

Fungicidas são considerados eficientes na proteção contra a ferrugem, mas sua aplicação pode ser contraditória quando, levado em conta que seu uso pode provocar efeitos ambientais adversos tais como o aumento ou seleção de linhagens resistentes. Várias estratégias alternativas ao uso de fungicidas são utilizadas para controlar os patógenos e aumentar a resistência da plantas. Tais medidas oferecem um manejo ecológico aliado à prioridade de uma produção de café sustentável. O melhoramento da resistência das plantas baseado na indução de resistência do hospedeiro é uma delas e torna-se uma importante opção para o controle da ferrugem em cafeeiros.

As fontes contendo silício (Si) vêm sendo extensivamente utilizadas com este propósito. O Si é conhecido há tempos por reduzir a incidência de doenças fúngicas em uma série de patossistemas (BÉLANGER; BENHAMOU; MENZIES, 2003; RODRIGUES et al., 2003; BOTELHO et al., 2005, FAUTEUX et al., 2005), além de estimular o crescimento e a produção vegetal através de várias ações indiretas, como o aumento no teor de clorofila; maior massa foliar (fresca e seca) específica; atraso na senescência; proteção contra estresses abióticos, como a redução da toxidez de alguns minerais; interações positivas com fertilizantes; aumento na proteção contra herbívoros, incluindo os insetos fitófagos e principalmente, diminuição na incidência de inúmeros fungos patogênicos (ADATIA; BESFORD, 1986; EPSTEIN, 1994; MARSCHNER, 1995; SAVANT; SNYDER; DATNOFF, 1997).

O modo de ação do Si nas plantas ainda não está elucidado apesar de haverem evidências de que o Si aja nos mecanismos gerais de defesa comum à maioria das espécies de plantas. Fauteux et al. (2005) sugere que o Si possua uma ação nos mecanismos de defesa compartilhado por todas as espécies de plantas como aqueles que levam à expressão

de genes do estresses. Tem sido mostrado que o Si pode agir como um estimulador das respostas de defesa em plantas ou um ativador de estratégicas proteínas de sinalização. Considerado biologicamente ativo, o Si desencadeia uma resposta de defesa mais rápida e mais extensa por interagir com vários componentes-chaves do sistema de sinalização do estresse levando a planta a um estado de resistência (FAUTEUX et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência das fontes de Si nos parâmetros de desenvolvimento como altura das plantas, número de folhas e área foliar bem como avaliar a redução da ferrugem em plantas de café suscetíveis de modo a estabelecer um método de manejo ecológico para uma produção sustentável da cultura do café diminuindo assim o uso do controle químico.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Produção de mudas de cafeeiro com o uso de Si.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico/SP. O delineamento estatístico adotado foi o de blocos inteiramente casualizados com 05 tratamentos pra cada fonte de Si utilizada e 01 controle negativo para cada fonte utilizada (sem aplicação se silicato), todos com 10 repetições, sendo cada repetição representada por uma planta de cafeeiro perfazendo assim um total de 110 plantas.

2 - Semeadura.

Sementes de café, (*Coffea arabica*, cv Mundo Novo, suscetível a todas as raças fisiológicas de *H. vastatrix*), foram fornecidas pela Cooperativa GARCAFÉ, Garça, SP. Foi realizada a semeadura indireta em caixas de madeira e o transplante para os recipientes apropriados foi feito no estágio palito-de-fósforo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura ambiente recebendo adubação mensal seguindo os tratos culturais recomendados. Os silicatos foram misturados de forma homogênea ao substrato no momento do transplante. As fontes de Si utilizadas foram silicato de potássio (UNAPROSIL) e silicato de cálcio e magnésio (Recmix[®]).

3 - Tratamentos.

Foram realizados 12 tratamentos. As aplicações bimestrais foram de 0.25, 1.25, 2.5, 4 e 5mM de Si na forma de silicato de potássio e silicato de Ca/Mg em experimentos separados. Como controle negativo foi realizado um tratamento sem a adição de Si ao solo

para cada fonte analisada. Foram realizados tratos culturais de acordo com os procedimentos usuais.

4 - Obtenção do patógeno.

Urediniosporos de *Hemileia vastatrix* Berkeley et Broome, raça II foram coletados na Fazenda Santa Elisa (IAC- Campinas) a partir de plantas de café naturalmente infectadas. Após a coleta, os urediniósporos foram peneirados a fim de retirar as impurezas sendo em seguida acondicionados em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido até o uso. Para o uso, os urediniósporos foram retirados do nitrogênio líquido e submetidos a choque térmico por 10min pela imersão dos criotubos em água aquecida a 40°C. Logo após, foram misturados com água destilada estéril para a obtenção de uma concentração de 2mg.mL⁻¹. A suspensão foi submetida a ultra-som (50Hz por 30 s – Sonorex RK 103) e mantida em agitação durante todo o processo de inoculação.

5 - Inoculação do patógeno.

Aos 6 meses de idade as plantas foram submetidas à inoculação com o patógeno. Os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pares de folhas das plantas de café foram marcados e então a suspensão foi aspergida apenas nas superfícies abaxiais das folhas. As plantas inoculadas foram mantidas no escuro com umidade relativa de 85% até o aparecimento dos sintomas.

6 - Avaliação da doença.

A avaliação dos sintomas foi feita a partir de 30 dias após a inoculação em cada par de folhas aspergidas de cada tratamento, determinando-se o número de lesões por folha por cm² (área foliar). Como lesões foram consideradas manchas cloróticas individualizadas. O procedimento utilizado para a contagem de lesões foi a imersão das folhas infectadas em água.

7 - Análise do Si no crescimento das plantas de café.

Aos 6 meses de idade as plantas de café foram submetidas a medição dos parâmetros de desenvolvimento (altura, contagem do número de folhas, área foliar do 3º par de folha de cada planta) para avaliação da influência das fontes de Si no crescimento das mesmas.

8 - Análises estatísticas.

Foram realizadas análises de variância paramétricas para todos os dados obtidos. Os dados foram analisados através de análise de regressão linear utilizando o programa "SAS for Windows" (SAS Institute, Cary, NC) através do procedimento REG (Proc reg). Os

coeficientes de correlação de Spearman (r) e de determinação (r^2) e a análise de regressão linear múltipla foram determinados através do procedimento “sort” do programa estatístico SAS (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises dos parâmetros de desenvolvimento em plantas de cafeeiros.

As análises apontaram que a interação fonte/dose não foi significativa com relação à altura das plantas. No entanto houve significância quando apenas uma fonte é comparada em relação às suas doses. Os valores obtidos com a análise de regressão para as fontes silicato de Ca/Mg e silicato de potássio estão ilustrados na Tabela 1.1.

Avaliando cada fonte isoladamente, houve diferença estatística ($Pr > F < 0,01$) somente entre as médias das alturas das plantas tratadas com silicato de K (Gráfico 1 e Tabela 1.1). À medida que aumentam as doses (em mM), a altura das plantas (em cm) aumenta à razão de 0,0415 cm para cada mM adicionado. As plantas que receberam adubação com silicato de Ca/Mg aparentemente apresentaram crescimento maior que as plantas tratadas com a outra fonte obtendo valores maiores das plantas controle, porém esta diferença não possui significado estatístico ($Pr > F = 1,62$). O mesmo ocorreu com as análises de área foliar e número de folhas por planta (Gráficos 2 e 3). A interação fonte/dose não apresentou significado estatístico em ambos os parâmetros, porém quando as fontes foram analisadas isoladas, somente as plantas tratadas com silicato de potássio apresentaram significado estatístico. (Tabelas 1.2 e 1.3). (Para o cálculo da área foliar foram utilizados os mesmos parâmetros citados por Favarin et al., 2002).

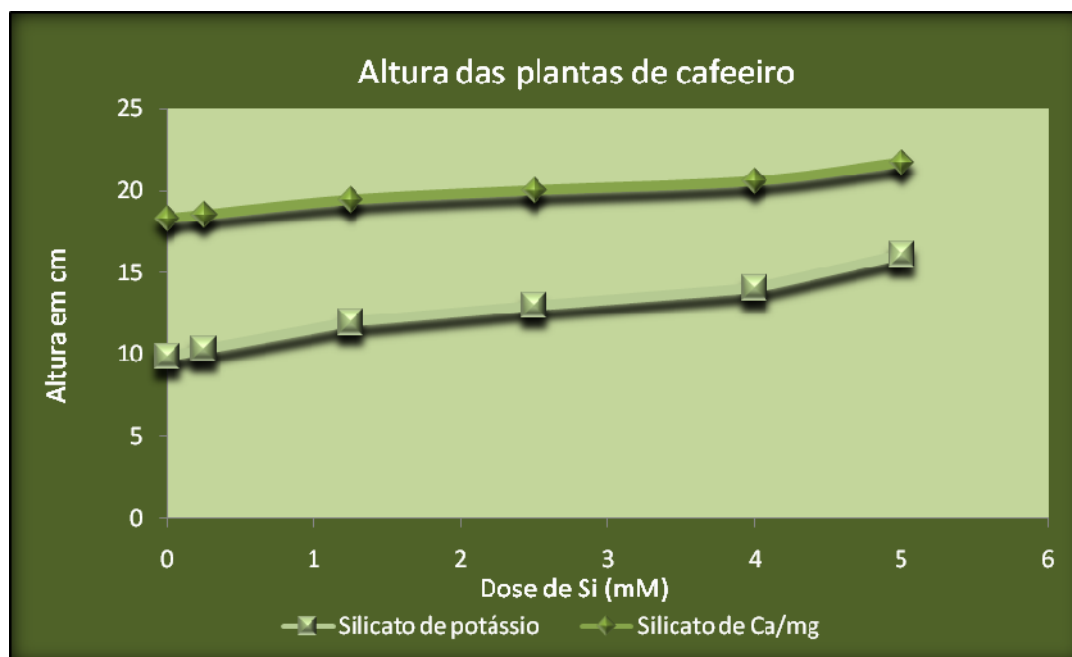


Gráfico 1. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros nos diferentes tratamentos com silicato em função das doses aplicadas.

Tabela 1.1 - Resultado das análises de regressão linear para altura das plantas.

Equação	Silicato de Ca/Mg	Silicato de potássio
Altura (cm)	$= 18,284 + 0,0229 \times \text{dose}$	$= 9,8809 + 0,0415 \times \text{dose}$
Pr > F	1,62	<0,01
Coef. variação	18,73%	20,51%
R ²	0,973	0,972

Os dados aqui apresentados mostram a comparação entre uma mesma fonte nas suas diferentes doses. A equação da reta expressa os valores da altura das plantas com o aumento da dose. Valores de Pr>F abaixo de 0,05 são significativos.

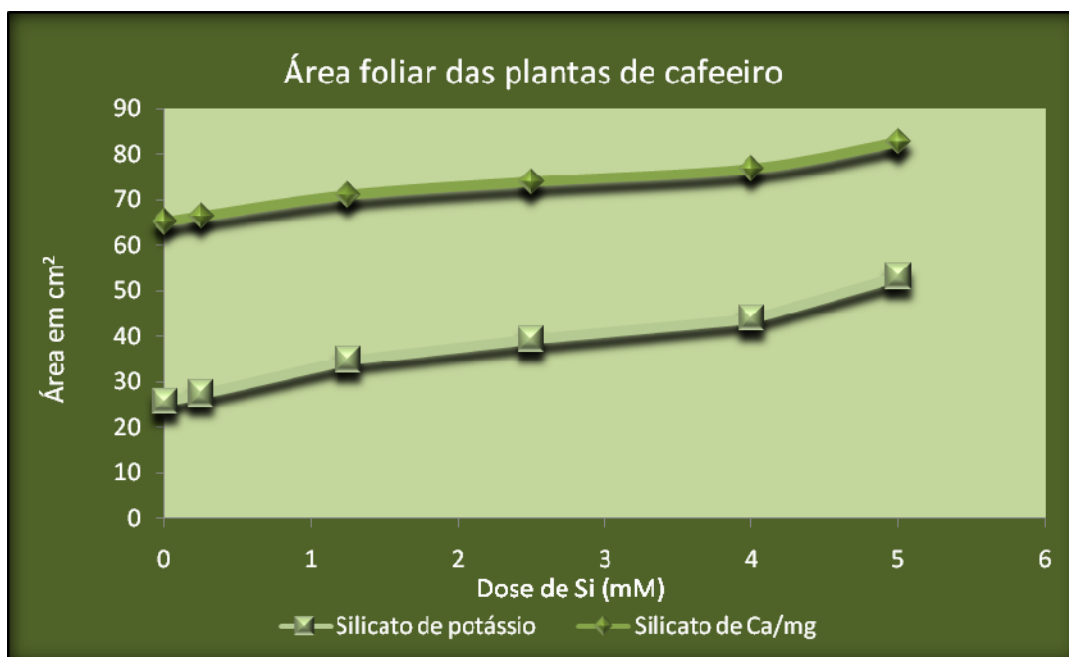


Gráfico 2. Representação gráfica da área foliar das plantas de cafeeiros nos diferentes tratamentos com silicato em função das doses aplicadas

Tabela 1.2 - Resultado das análises de regressão linear para área foliar (cm²) das plantas.

Equação	Silicato de Ca/Mg	Silicato de potássio
Área foliar (cm²)	= 65,24 + 0,116 x dose	= 25,59 + 0,1840 x dose
Pr > F	2,85	<0,01
Coef. Variação	28,60%	28,98%
R²	0,973	0,973

Os dados aqui apresentados mostram a comparação entre uma mesma fonte nas suas diferentes doses. A equação da reta expressa os valores da área foliar das plantas com o aumento da dose. Valores de Pr>F abaixo de 0,05 são significativos.

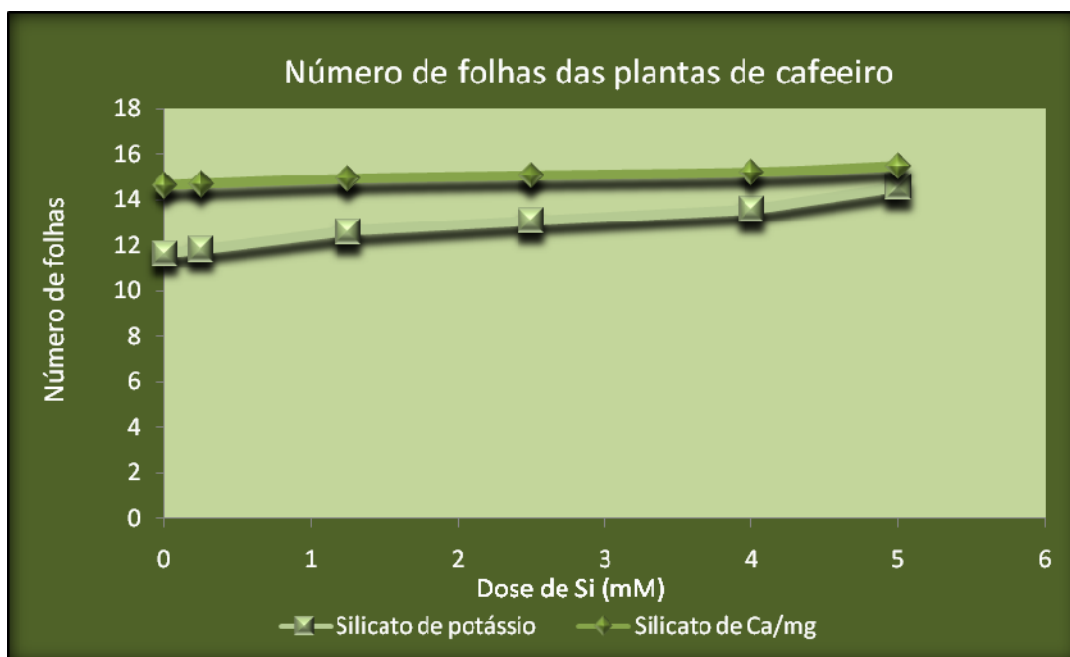


Gráfico 3. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros nos diferentes tratamentos com silicato em função das doses aplicadas

Tabela 1.3 - Resultado das análises de regressão linear para número de folhas das plantas.

Equação	Recmix®	Silicato de potássio
Número de folhas	$= 14,63 + 0,0056 \times \text{dose}$	$= 11,629 + 0,0194 \times \text{dose}$
Pr > F	23,57	<0,01
Coef. variação	12,65%	14,04%
R²	0,973	0,973

Os dados aqui apresentados mostram a comparação entre uma mesma fonte nas suas diferentes doses. A equação da reta expressa os valores da área foliar das plantas com o aumento da dose. Valores de Pr>F abaixo de 0,05 são significativos.

No uso de diferentes fontes de Si, deve-se considerar variáveis os tratamentos com os íons Ca, Na, P, e S diretamente aportados pela fonte ou pelo ajuste do pH, que podem também induzir a um aumento da condutividade, absorção e translocação. De acordo com Marschner (1995) o K, presente em elevadas quantidades nos tecidos vegetais, pode interferir na translocação e na disponibilidade fisiológica do Mg e do Ca, resultando em desordens metabólicas. Em plantas tratadas com K, Pozza et al. (2001) puderam observar uma diminuição dos teores foliares de Ca.

A escassez de informações sobre os efeitos do Si no crescimento e desenvolvimento das plantas está de acordo com outros estudos onde o foco principal está direcionado aos efeitos deste elemento na visualização da diminuição dos sintomas da ferrugem em plantas de café. Dann e Muir (2002) trabalhando com ervilhas também puderam verificar que não há diferença estatística no peso de matéria seca em plantas tratadas e não tratadas com Si.

Plantas de *Arabidopsis* quando submetidas somente ao tratamento com Si e não submetidas a nenhum tipo de estresse, seja este biótico ou abiótico, apresentaram a super-expressão de apenas 2 genes de 40.000 genes analisados (FAUTEUX et al., 2006). Estes resultados mostraram que o Si aparentemente não exerce nenhum efeito no metabolismo, desenvolvimento e crescimento das plantas quando mantidas em situações controladas (sem estresse) o que, segundo os autores, confirma a sua não essencialidade no crescimento das plantas.

Redução dos sintomas da ferrugem em plantas de cafeteiros suscetíveis.

O dados sobre lesões foi determinado através do número de lesões por folha em função da área foliar (cm²). Diferenças estatisticamente significante ($p < 0,01$) foram observadas em relação ao número de lesões e doses no tratamento com silicato de potássio (Tabela 1.4) (Gráfico 4). O mesmo não pôde ser observado no tratamento com silicato de cálcio e magnésio.

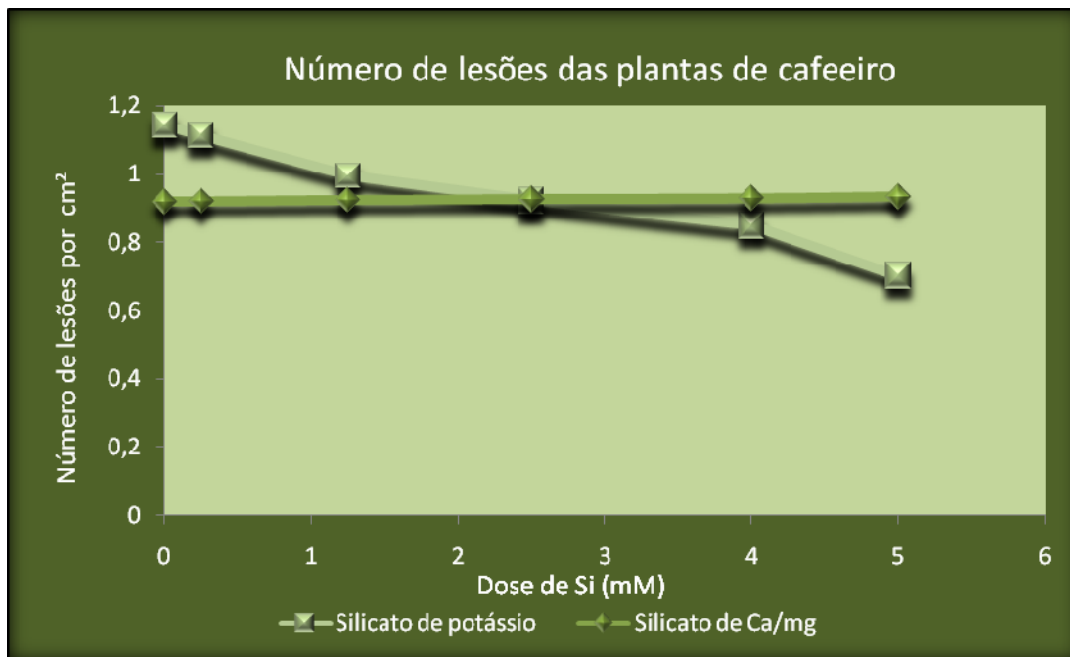


Gráfico 4. Representação gráfica da altura das plantas de cafeeiros nos diferentes tratamentos com silicato em função das doses aplicadas

Tabela 1.4 - Resultado das análises de regressão linear para número de lesões/cm² em folhas de cafeeiro.

Equação	Silicato de Ca/Mg	Silicato de potássio
No. Lesões por cm ²	= 0,9184 + 0,0001 x dose	= 1,4117 – 0,00293 x dose
Pr > F	82,72	<0,01
Coef. variação	21,16%	25,08%
R ²	0,973	0,971

Foram analisados os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pares de cada planta de café inoculada. Foi determinado como lesão manchas cloróticas. Os dados aqui apresentados mostram a comparação entre uma mesma fonte nas suas diferentes doses. A equação da reta expressa os valores da área foliar das plantas com o aumento da dose. Valores de Pr>F abaixo de 0,05 são significativos.

Tabela 1.5 - Proteção conferida pelo Si em plantas de cafeeiros tratadas com diferentes fontes.

Doses	Silicato de Ca/Mg	Silicato de potássio
0mM	controle	controle
0,25mM	- 108,05%	-43%
1,25mM	-16%	33%
2,5mM	-2,80%	18%
4mM	-61%	36%
5mM	-42%	60%

No tratamento com silicato de potássio à medida que aumentam as doses (em mM) a redução do número de lesões por área reduz significativamente ($Pr > F > 0,01$) à razão de 0,00293 para cada mM acrescentado. O mesmo não ocorre no tratamento com silicato de Ca/Mg onde o coeficiente de regressão não difere estatisticamente de zero e também não possui significado estatístico. Alguns experimentos descrevem que à medida que aumentam as doses de K, as concentrações de Ca diminuem sendo este um dos fatores preponderantes a maior susceptibilidade à doenças (MARCHNER, 1995; JUNIOR et al., 2003). Pozza et al. (2001) e Junior et al. (2003) observaram também que a maior severidade da mancha de olho pardo em cafeeiros foi obtida com a elevação das doses de K concordando com os estudos de Moraes et al. (1976) onde é relatado o aumento significativo da porcentagem de incidência da ferrugem nas plantas de café que receberam altas doses de K. No caso deste trabalho quando utilizada a fonte com K, o número de lesões diminuiu significativamente, o que se pode sugerir que o elemento atuante seja mesmo o Si. Rodrigues et al. (2005) estudando plantas de soja, também verificaram que a ferrugem diminuiu com a aplicação de silicato de potássio enquanto que no tratamento apenas com KOH as lesões não apresentaram redução.

Muitos autores citam a ação do Ca na redução da severidade dos sintomas de doenças em plantas. De acordo com Elad e Kirshner (1992), a severidade de *B. cenerea* em plantas de ruscus pôde ser reduzida aplicando-se Ca. Segundo os resultados obtidos, este elemento não foi um fator preponderante para a redução dos sintomas da ferrugem em plantas de cafeeiro onde não houve um resultado significativo quanto à redução do número de lesões com o aumento das doses de silicato de Ca/Mg.

O mesmo efeito pôde ser observado por Botelho et al. (2005) e Amaral (2005) em plantas de cafeeiro submetidos a inoculação com *Cercospora coffeicola*. Houve uma redução de aproximadamente 47% das lesões na dose de 2,27mL/L (AMARAL, 2005).

Nojosa (2003) trabalhando com plantas de cafeeiros inoculadas com *H. vastatrix* tratadas com silicato de potássio, também observou uma redução na incidência e severidade da doença em função das doses de Si aplicada. O aumento na resistência de plantas de café à cercosporiose, de acordo com Pozza et al. (2004) é devido ao espessamento cutícula e ao aumento da absorção de micronutrientes proporcionado pelo Si. Foram observadas neste trabalho também através de microscopia eletrônica de varredura uma camada mais espessa cobrindo parcialmente os estômatos na superfície inferior da folha das mudas de cafeeiro tratadas com silicato de cálcio no solo o que dificulta a penetração direta (pelo estômato) ou indireta (pela cutícula) do fungo.

Amaral (2005) também verificou, por meio de microscopia de varredura, que houve formação de uma cutícula mais espessa na superfície inferior das folhas de cafeeiro tratadas com 1,5mL/L de silicato de potássio. Esta cutícula seria formada pelo acúmulo de cera na superfície o que a tornaria hidrofóbica impedindo a formação de um filme de água, importante para os processos vitais da patogênese como a germinação, penetração. Outra observação igualmente importante foi que em plantas tratadas os estômatos eram menos visíveis do que em plantas não tratadas. Outra característica nitidamente notada foi a rigidez nas folhas tratadas com Si em relação às plantas que cresceram na ausência deste elemento.

Muitos estudos demonstram a eficiência do Si em controlar sintomas da doença causadas por fungos patogênicos (BÉLANGER et al., 1995; DATNOFF et al., 1991; EPSTEIN, 1994; BÉLANGER, et al., 2003; CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994; FAUTEUX et al., 2005), no entanto, esses efeitos são mais estudados em plantas acumuladoras de Si e em curcubitáceas (FAWE et al., 2001; MA et al., 2001). Moraes (2004) também pôde demonstrar que a incidência da antracnose em feijão diminuiu com a aplicação de silicato via solo.

Entre os mecanismos pelos quais o Si pode conferir resistência à determinada doença citam-se barreiras estruturais (BOWEN et al., 1992; EPSTEIN, 1999; RODRIGUES et al., 2003), ou ativação de barreiras químicas e bioquímicas da planta (BÉLANGER; BENHAMOU; MENZIES, 2003; RODRIGUES et al., 2003). Em plantas de

cafeeiro esses mecanismos de resistência ainda não foram totalmente esclarecidos, uma vez que aparentemente, a cultura não absorve eficazmente este elemento. Um dos prováveis mecanismos citados seria a formação do complexo Si - grupo hidroxila dos resíduos de aminoácidos das proteínas quinase. Quando há formação deste complexo o Si poderia atuar como ativador destas proteínas que por sua vez ativariam a transcrição nuclear de proteínas de defesa. Este complexo formado, por ser estável, talvez não seja detectado a presença do Si nos testes quantitativos de análise justificando assim seu baixo teor encontrado nas plantas de cafeeiro.

Alguns genes de defesa já foram identificados em plantas de café em resposta à agentes patogênicos ou outros compostos elicitores (GUZZO, 2004; FERNANDEZ et al., 2004). Genes que codificam proteínas envolvidas nas respostas de hipersensibilidade também foram identificados e quantificados (FERNANDEZ et al., 2004,). Dentre os genes diferencialmente expressos destacam-se 3: Fator de transcrição do WRKY (*CaWRKY*), uma proteína de resistência a doença não específica homóloga a *Arabidopsis* (*CaNDRI*) e uma proteína de função desconhecida (*CaRIII*). Esses genes apresentaram-se induzidos durante a infecção do fungo *H. Vastatrix*. *CaWRKY* foi o que apresentou uma indução mais alta e começou nas primeiras 12 horas após a inoculação com um pico de 18 horas (ALARY et al., 2004).

Outros genes importantes como os relacionados à defesa foram identificados em cafeeiros resistentes e suscetíveis à ferrugem submetidos a tratamento com elicitores (FERNANDEZ et al., 2004; GUZZO et al., 2004). Com estes resultados pode-se notar que mesmo as plantas suscetíveis são capazes de reagir à infecção através da estimulação das respostas de defesa quando estimuladas por elicitores.

É documentado que a suscetibilidade ou resistência são determinadas não somente pela presença ou ausência de genes de resistência, mas pela rapidez e magnitude pela qual a informação genética é expressa (KUC, 1990; PAN; YE; KUC, 1991). Os perfis de expressão em plantas suscetíveis e resistentes são similares nos estágios primários da infecção, mas a amplitude deste perfil nas interações compatíveis é menor que nas interações incompatíveis (KATAGIRI, 2004). Esta informação é reforçada pelos dados presentes neste estudo onde são mostradas que mesmo as plantas geneticamente suscetíveis e tratadas com Si apresentam uma redução significativa do número de lesões quando comparadas às plantas não tratadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATIA, M. H.; BESFORD, R. T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 58, p. 343-351, 1986.

ALARY, L. ET AL. Characterization of the early response of coffee to *Hemileia vastatrix* using real-time quantitative RT-PCR. In: ASIC Conference, 20., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Bangalore, 2004. Disponível em: <http://www.asic-cafe.org>. Acesso em janeiro 2007:

AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiros contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.** 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BÉLANGER, R. R. et al. Soluble silicon - its role in crop and disease management of greenhouse crops. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 4, p. 329-336, 1995.

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**, St. Paul, v. 93, n. 4, p. 402-412, 2003.

BOTELHO, D. M. S. et al. Effect of silicon doses and sources on the intensity of the brown eye spot of coffee seedlings. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, 2005.

BOWEN, P. et al. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 117, p. 906-912, 1992.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 236-242, 1994.

CHÉRIF, M. et al. Yield of cucumber infected with *Pythium aphanidermatum* when grown with soluble silicon. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 896-897, 1994.

DANN, E.K.; MUIR, S. Peas growth in media with elevated plant-available silicon levels have higher activities of chitinase and β -1,3 glucanase, are less susceptible to a fungal leaf spot pathogen and accumulate more foliar silicon. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 31, p. 9-13, 2002.

DATNOFF, L. E. et al. Effect of calcium on blast and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 7, p. 729-732, 1991.

ELAD, Y.; KIRSHNER, B. Calcium reduces *Botrytis cinerea* damages to plants of *Ruscus hypoglssum*. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 20, n. 4, p. 285-291, 1992.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 11-17, 1994.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

FAUTEUX, F. et al. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FAUTEUX, F. et al. The protective role of silicon in the *Arabidopsis* – powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.

FAWE, A. et al. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 2001. p. 159-169.

FAVARIN, J. L. et al. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002.

FERNADEZ, D. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 527–536, 2004.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

JUNIOR, D. G. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, 2003.

KATAGIRI, F. A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 506-511, 2004.

KUC, J. Induced systemic resistance. In: WALTERS, D. R. (Ed.). **Aspects of applied biology: physiological responses of plants to pathogens**. Dundee: Association of Applied Biologists, 1995. v. 42, p. 235-242.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 2001. p. 159-169.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995. 887 p.

MATIELLO, J. B. **O café: Do cultivo ao consumo**. São Paulo: Editora Globo, 1991.

MORAES, W. B. C. et al. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, p. 39-43, 1976.

MORAES, S. R. G. **Fontes e doses de silício na intensidade da antracnose do feijoeiro**. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito dos indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. E *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC, J. Association of β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 25-39, 1991.

POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 53-60, 2001.

POZZA, A.A.A. **Silício em mudas de cafeeiro: efeito na nutrição mineral e na suscetibilidade à cercosporiose em três variedades**. 2004. 130 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

RODRIGUES, F. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 535-546, 2003.

RODRIGUES, F. A. et al. Effect of foliar application of potassium silicate on asian soybean rust development on soybean. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 105.

SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures: usage**. Version 8.1. Cary, 2000. 1 CD-ROM.

SAVANT, N. K.; SNYDER, G. H.; DATNOFF, L. E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, v. 58, p. 151-199, 1997.

CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SI EM PLANTAS DE CAFEEIROS

INTRODUÇÃO

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante no solo e é encontrado em quantidades relativamente abundantes em todas as plantas. No entanto, as espécies de plantas diferem significativamente quanto ao acúmulo de Si com valores variando de 0,1% a 10% de peso seco (MA et al., 2002). Takahashi e colaboradores (1990) fizeram uma ampla revisão sobre as concentrações de Si em aproximadamente 500 espécies de briófitas e Angiospermas (MA; TAKAHASHI, 2002). Os resultados mostraram que há uma distribuição característica do acúmulo de Si nos reinos das plantas. Nas plantas superiores somente as *Gramineae* e *Cyperaceae* mostraram alto acúmulo de Si. Plantas pertencentes as *Cucurbitales*, *Urticales*, e *Commelinaceae* mostraram teores intermediários de acúmulo de Si enquanto que a maioria das outras espécies mostraram pouco acúmulo de Si.

Esta diferença é atribuída à habilidade em absorver e transportar o Si (TAKAHASHI; MA; MIYAKE, 1990). Plantas de arroz podem acumular altas quantidades de Si que pode chegar a várias vezes mais que alguns nutrientes essenciais, como nitrogênio, potássio e fósforo (SAVANT; SNYDER; DATNOFF, 1997). Três diferentes modos de absorção de Si foram propostos para as plantas que possuem diferentes níveis de acúmulo de Si que são o transporte ativo, passivo e “rejective uptake” (TAKAHASHI; MA; MIYAKE, 1990). As espécies com o modo ativo de absorção de Si como o arroz (MA et al., 2006), o absorvem mais rápido que a água resultando em uma redução de Si na solução do solo ou nutritiva. As espécies com o transporte passivo tais como pepino, melão morango e soja (TAKAHASHI; MA; MIYAKE, 1990; MA et al., 2001; MITANI; MA, 2005), cuja razão de absorção é semelhante à razão de absorção da água, não causam mudanças na concentração de Si na solução. Já as espécies com o modo “rejective uptake” de absorção de Si como tomate (MITANI; MA, 2005) e feijão (LIANG; SI; ROMHELD, 2005) tendem a excluir o Si, o que pode ser demonstrado pelo aumento da concentração de Si na solução. No entanto, os mecanismos envolvendo diferentes maneiras de absorção de Si nas plantas ainda não está totalmente estabelecido.

A classificação das plantas de café em alguns dos grupos de plantas acumuladoras ou não, bem como o modo de absorção do Si são temas de discussão. Em vista disso o objetivo deste ensaio foi avaliar os teores foliares de Si em plantas de cafeeiros submetidos a diferentes modos de aplicação sendo eles foliar e via fornecimento do solo

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Determinação do teor de Si em plantas de cafeeiros.

Neste ensaio, as determinações de Si foram divididas da seguinte forma:

A - Teor de Si em plantas de cafeeiro tratadas com duas fontes distintas via solo.

O delineamento estatísticos bem como tratamentos estão descritos no capítulo 1. As folhas das plantas de cafeeiro foram colhidas e os teores de Si avaliados.

B - Teor de Si em plantas de cafeeiro não inoculadas mantidas em solução nutritiva.

O delineamento estatístico adotado foi o de blocos inteiramente casualizados com 02 tratamentos e 10 repetições. Durante 20 dias as plantas de café foram mantidas em solução nutritiva líquida incrementada com 0 ou 4mM de Si cuja fonte foi silicato de potássio. Após este período, partes das plantas foram coletadas para determinação de Si.

2 - Preparo das amostras para determinação de Si.

As folhas coletadas foram lavadas usando-se uma solução detergente e exaguadas duas vezes com água deionizada. Logo em seguida, foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C por 72 horas e após este período foram moídas em moinho tipo Willey. Imediatamente após a moagem as amostras foram pesadas (100mg) e colocadas em tubos plásticos de 15mL de capacidade.

3 - Determinação do Si.

Amostras receberam 2mL de H₂O₂, 3mL de NaOH e em seguida foram autoclavadas por 1h a 120°C e deixadas em repouso até que os resíduos decantassem. Uma alíquota de 1mL do sobrenadante foi retirada e, adicionados a ela, 19mL de água destilada, 1mL de HCl (1:1) e 2 mL de molibdato de amônio. Após 10 minutos foram adicionados 2mL de ácido oxálico e novamente agitados. Aos 5 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 410nm. Foi realizada uma curva padrão antes da determinação das amostras.

4 - Análises estatísticas.

Fornecimento de Si via solo: Foram realizadas análises de variância paramétricas para todos os dados obtidos. Os dados foram analisados através de análise de regressão linear utilizando o programa "SAS for Windows" através do procedimento REG (Proc reg). Os coeficientes de correlação de Spearman (r) e de determinação (r²) e a análise de regressão linear múltipla foram determinados através do procedimento "sort" do programa estatístico SAS (2000).

Para o ensaio das plantas de cafeeiro mantidas em solução nutritiva: Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do software ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA e AZEVEDO, 2002; SILVA e AZEVEDO 2006)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A - Teor de Si em plantas de cafeeiro tratadas com duas fontes distintas via solo. Nesta parte do ensaio foram realizadas quantificações dos teores de Si nas folhas das plantas de café submetidas a adição de Si no substrato. Para obter uma visão geral, as folhas foram divididas em 3 grupos:

- 1 – Folhas não inoculadas – pares de folhas dos ramos próximos ao substrato;
- 2 – Folhas inoculadas – pares de folhas dos ramos entre os próximos ao solo e os primeiros;
- 3 – Folhas não inoculadas – primeiro par de folhas – ramos da parte superior da planta.

Quando a fonte incorporada ao solo foi o silicato de potássio, os pares de folhas que se localizam mais próximos ao solo foram os que apresentaram teores de Si sutilmente maiores seguidos pelos pares intermediários e o primeiro par, porém sem significado estatístico. Resultados similares foram obtidos também quando a fonte utilizada foi o silicato de Ca/Mg, porém os teores de Si com o uso desta fonte foram menores (Tabela 2.1) (Os valores dos teores médios de Si encontrados nas folhas de cafeeiro encontram-se no apêndice A).

As análises estatísticas realizadas revelaram que não há correlação entre dose/fonte para o teor de Si nas plantas tratadas, bem como a localização dos pares de folhas. Igualmente em todas os pares de folhas analisados, o teor de Si encontrado foi o mesmo independente de estarem próximos ou distantes do substrato, confirmando portanto, a deficiência na translocação deste elemento em plantas de cafeeiro.

Tabela 2.1 - Resultado das análises de regressão linear para o teor de Si em folhas de cafeeiro.

	Equação	Silicato de Ca/Mg	Silicato de potássio
1	% Si	1,4607 – 0,066 x dose	1,5053 – 0,279 x dose
	Pr > F	0,1550	0,3472
	Coef. variação	12,86%	7,80%
	r²	0,998	0,998
2	% Si	1,3393 – 0,099 x dose	1,2207 – 0,356 x dose
	Pr > F	0,1590	0,3707
	Coef. variação	24,15%	13,46%
	r²	0,999	0,998
3	% Si	0,7378 – 0,0089 x dose	0,6133 + 0,1549 x dose
	Pr > F	0,8709	0,1514
	Coef. variação	22,64%	31,67%
	r²	0,998	0,999

Os dados aqui apresentados mostram a comparação entre uma mesma fonte nas suas diferentes doses. A equação da reta expressa os valores da área foliar das plantas com o aumento da dose. Valores de Pr>F abaixo de 0,05 são significativos.

É possível observar certa deficiência das plantas de café em translocar o Si das raízes até a parte aérea da plantas. Dados atuais apontam que não há uma translocação eficiente de silicato de potássio em plantas de cafeeiro mesmo quando o Si é aplicado diretamente nas folhas por aspersão de uma solução de Si e portanto não poderia controlar eficazmente a infecção causada pelo fungos patogênico causador da ferrugem (RODRIGUES et al., 2005). Neste estudo também foi observada a mesma situação no que diz respeito à translocação de Si, porém em ensaio anterior a este foi possível sim observar uma correlação entre as doses de silicato de potássio aplicadas e a redução no número de lesões causadas pelo *Hemileia vastatrix*.

As concentrações encontradas nas plantas de café as coloca no grupo das plantas não acumuladoras de Si. Algumas espécies de plantas não acumuladoras de Si como morango e tomate, tiveram um melhor desenvolvimento quando suplementadas com Si. Nos estudos com morango foi possível observar diminuição da severidade da doença causada por *Pestalotia longisetula* (REZENDE et al., 2007). Neste estudo, as plantas de cafeeiro, igualmente não acumuladoras, obtiveram resultados satisfatórios em resposta à suplementação com Si e à diminuição dos níveis de lesão da ferrugem. Aumentando a capacidade das plantas em absorver Si, pode-se também aumentar seu efeito benéfico nessas plantas. O conhecimento de um sistema ativo de transporte de Si em arroz pode abrir caminhos promissores para estudos em plantas não acumuladoras em estudos.

B - Teor de Si em plantas de cafeeiros não inoculados mantidos em solução nutritiva:

Neste ensaio onde as plantas se mantiveram em solução nutritiva os resultados foram similares. Quando é comparado o teor de Si nas diferentes doses, não há diferença estatística significativa. No entanto, quando a comparação é feita com relação às partes da plantas, o resultado mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Pode-se portanto, inferir que a maior concentração de Si está nas raízes seguida das folhas e caules e novamente não há uma translocação efetiva (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Teor médio (em %) de Si nas folhas de cafeeiro dos ensaios 1 e 2.

Partes da planta	0 mM	4mM
Folhas	0,15 b	0,15 B
Caule	0,08 a	0,09 A
Raiz	0,20 c	0,21 C

Os valores ilustram a porcentagem de Si em amostra composta das folhas por tratamento/dose. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente.

Há muitas hipóteses sobre o papel do Si em plantas não acumuladoras. Uma delas inclui sua participação no balanço nutricional, estrutura da planta e resistência ao estresse que é convertido em um melhor crescimento e reduzir perdas na cultura (HODSON et al., 2005). Alguns pesquisadores também sugerem a presença de proteínas de membrana que agiriam como transportadores ativos nas raízes de plantas acumuladoras (MA et al., 2002; LIANG; SI; ROMHELD, 2005). Provavelmente isso pode ser um ponto a ser investigado relacionado às razões pelas quais o Si não é ativamente translocado da raiz para a parte aérea das plantas de café e por isso não é tão bem absorvido quando aplicado ou via foliar ou via solo.

Tanto o transporte mediado por um transportador ativo como as difusões passivas estão envolvidos no transporte de Si pela raiz e ambos o processos envolvendo um transportador tem um gasto de energia pela planta. A concentração de Si no xilema de arroz é 20 e 100 vezes maior que em pepinos e tomate respectivamente. Possivelmente o fato de o Si ser encontrado em menores quantidades nas plantas de café deve-se ao fato de que as plantas de café não possuem uma proteína de membrana que aja como transportador ativo de Si. Em um estudo sobre a cinética do Si foi demonstrado que o transporte de Si também é mediado por certo tipo de transportador em arroz mas por difusão passiva em tomate e pepinos indicando que apesar de não possuir um transportador, o transporte de Si é realizado de outra maneira. A identificação destes loci foi feita por Ma et al. (2005), onde é revelado que este gene está mapeado no cromossomo 2 de arroz flanqueado pelos

marcadores microssatélites RM5303 e EST E60168. A proteína transportadora está localizada na membrana plasmática do lado distal das células endodérmicas e exodérmicas. Estes resultados indicam que a alta acumulação de Si em plantas de arroz é devido a presença destes transportadores nas raízes e no xilema (MITANI; MA, 2005).

Diante destes resultados podemos dizer que em plantas de café, aparentemente não acumuladoras de Si, este mineral exerce alguma função nestas plantas como por exemplo, diminuição de sintomas de doenças importantes nesta cultura. Um ponto a ser discutido seria a metodologia utilizada para as análises dos teores de Si que poderia estar ocultando os resultados por se tratar de uma técnica pouco sensível. Novas técnicas como o ICP-MS e Si radioativo vêm sendo desenvolvidas e permitem uma maior sensibilidade na detecção de Si em plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HODSON, M. J. et al. Phylogenetic Variation in the Silicon Composition of Plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96 n. 6, p. 1027-1046, 2005.

LIANG, Y.; SI, J.; ROMHELD, V. Silicon uptake transport is an active process in *Cucumis sativus*. **New Phytologist**, London, v. 167, p. 797-804, 2005.

MA, J. F.; TAKAHASHI, E. **Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan**, Amsterdam: Elsevier Science, 2002.

MA, J. F. et al. A Rice mutant defective in Si uptake. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 2111-2117, 2002.

MA, J. F. et al. Characterization of the Silicon Uptake System and Molecular Mapping of the Silicon Transporter Gene in Rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136 n. 2, p. 3284–3289, 2005.

MITANI, N.; MA, J. F. Uptake system of silicon in different plant species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 414, p. 1255-1261, 2005.

REZENDE, D. C. et al. Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da mancha de pestalotia (*Pestalotia longisetula*) do morangueiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SILÍCIO NA AGRICULTURA, 4., 2007, Botucatu. Botucatu: UNESP, 2007. p. 259.

RODRIGUES, F. A. et al. Effect of foliar application of potassium silicate on angular leaf spot development on beans. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2005. p. 105.

SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures**: usage. Version 8.1. Cary, 2000. 1 CD-ROM.

SAVANT, N. K.; SNYDER, G. H.; DATNOFF, L. E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, New York, v. 58, p. 151-199, 1997.

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6., 1996, Cancun. **Proceedings...** Cancun: ASAE, 1996. p. 294-298.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4,n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRES ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings...** Orlando: ASAE, 2006. p. 393-396.

TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments in Agricultural and Food Chemistry**, Mumbai, v. 2, p. 99-122, 1990.

CAPÍTULO 3. BIOQUÍMICA DA INTERAÇÃO *Coffea arabica*- *Hemileia vastatrix*- SI: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA E AO ESTRESSE OXIDATIVO

INTRODUÇÃO

Os mecanismos pelos quais os patógenos causam doenças são governados por uma série de eventos. Nas reações incompatíveis uma série de respostas de defesa frequentemente resultando no colapso localizado nos tecidos adjacentes aos do sítio de infecção ocorre, resultando na resistência à doença e é designada pela resposta de hipersensibilidade devido ao reconhecimento e interação dos componentes bioquímicos tanto da célula hospedeira quanto do patógeno (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). Nessa reação há produção de intermediários reativos de oxigênio conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO's), incluindo O_2^- , H_2O_2 e OH^- . Juntamente com a resposta de hipersensibilidade ocorre a ativação transcricional de genes de defesa codificadores de enzimas para a biossíntese de fitoalexinas, ligninas, e enzimas líticas como as quitinases e glucanases (LAMB; DIXON et al., 1997). No entanto, em reações compatíveis a doença pode ocorrer devido a um atraso na resposta de defesa da planta na presença do patógeno. Alguns autores sugerem que as cultivares suscetíveis podem ser manipuladas para a resistência ao ataque dos patógenos alterando o tempo e a magnitude das respostas de defesa (KUC; STOBEL, 1992) através de compostos chamados elicitores que são substâncias que induzem reações de defesa nas plantas, incluindo a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese como as PR proteínas (quitinases e glucanases).

Aumentando a capacidade das plantas em proteger-se dos estresses bióticos e abióticos tem sido a base de estudos de muitos pesquisadores. Em plantas suscetíveis o mecanismo de resistência é falho mais é possível induzir tais mecanismos através da elicitação com compostos elicitores.

O silício (Si) tem sido estudado como um elicitor natural em muitas plantas. Os efeitos benéficos do Si nas plantas sob estresse biótico e abiótico têm sido reportados em uma série de culturas como arroz, trigo, pepino, cana de açúcar (EPSTEIN, 1994; LIANG et al. 1996; EPSTEIN, 1999; LIANG et al., 1999; LIANG; DING 2002).

A indução de resistência em plantas pode ser definida como a habilidade das plantas em prevenir ou restringir o desenvolvimento e a consequente multiplicação de um agente patogênico. A participação das quitinases e glucanases na defesa ativa das plantas contra

patógenos foi proposta antes mesmo de serem identificadas entre as PR proteínas (ABELES et al., 1971). Muitos fungos contêm glucanas e quitinas nas paredes celulares (BARTNICKI-GARCIA, 1968; WESSELS; SIETSMA, 1981), enquanto que a quitina não foi encontrada em plantas. Apesar das duas enzimas terem a capacidade de, isoladamente, degradarem a parede celular de fungos (BOLLER et al., 1983; MAUCH; MAUCHI-MANI; BOLLER, 1988; YOUNG; PEGG, 1982), foi demonstrado que a combinação das duas pode restringir mais efetivamente o crescimento dos fungos quando testado *in vitro* (MAUCH; MAUCHI-MANI; BOLLER, 1988; SCHLUMBAUM et al., 1986).

Outra enzima importante no mecanismo bioquímico de defesa é a fenilalanina amônia-liase (PAL). Esta é uma enzima chave na determinação da razão de compostos fenólicos através da rota dos fenilpropanóides.

Em um estudo anterior foi possível verificar que o silício pode reduzir o número de lesões causadas pelo fungo patogênico *Hemileia vastatrix* em plantas de cafeeiro suscetíveis. Porém os mecanismos pelo qual isto ocorre ainda não puderam ser elucidados. Neste sentido, este trabalho visa complementar os estudos anteriores da resistência a ferrugem conferida pelo silício através da análise das atividades das enzimas relacionadas à defesa (quitinase, glucanase e PAL) e ao estresse oxidativo (catalase, peroxidase, superóxido desmutase) em plantas de cafeeiro suscetíveis elucidando assim os processos bioquímicos envolvidos na resistência

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Laboratório de Biologia Celular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura. O delineamento estatístico adotado foi o de bloco inteiramente casualizados com 4 tratamentos e 25 repetições, sendo cada repetição representada por uma planta perfazendo um total de 100 plantas. Os tratamentos consistiram-se de 1: Plantas de cafeeiro suscetível (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo) não tratadas com Si; 2: Plantas de cafeeiros suscetíveis tratadas com Si; 3: Plantas de cafeeiro resistentes (*Coffea arabica* cv. Obatã) não tratadas com Si e 4: Plantas de cafeeiros resistentes tratadas com Si.

1 - Semeadura: Sementes de café, (*Coffea arabica*, cv Mundo Novo, suscetível a todas as raças fisiológicas de *H. Vastatrix* e *Coffea arabica* cv Obatã, resistentes ao *H. vastatrix*), foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Foi realizada a semeadura

indireta em caixas de madeira e o transplante para os recipientes apropriados foi feito no estágio palito-de-fósforo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura ambiente recebendo adubação mensal seguindo os tratos culturais recomendados. Após 6 meses as plantas foram transferidas para as soluções nutritivas.

2 - Tratamento das plantas de cafeeiro: As plantas de cafeeiro *Coffea Arabica* cv. Mundo Novo (suscetível à ferrugem) e *Coffea Arabica* cv Obatã (resistente à ferrugem) foram mantidas em solução nutritiva com aeração constante em vasos 2,0 L e foram trocadas uma vez por semana. A composição da solução nutritiva foi a seguinte: 7mM K (KNO_3), 1,5mM Ca ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), 0,6mM Mg (MgSO_4), 0,6mM P ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), 0,8mM S (MgSO_4), 7,0mM N (NH_4NO_3). Os tratamentos com Si foram realizados adicionando 7mM de silicato de potássio à solução nutritiva. O K adicional introduzido pela fonte silicato de potássio foi igualado nas plantas controle com KNO_3 .

3 - Obtenção e inoculação do patógeno A obtenção do patógeno bem como sua inoculação estão descritas no capítulo 1. As folhas das plantas de cafeeiro foram coletadas em diferentes intervalos de tempo após a inoculação (0, 24, 48, 72 e 96 horas) para a extração de proteínas.

4 - Extração de proteínas: As folhas de cafeeiro foram coletadas e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido para o transporte até o local do processamento das amostras. Os extratos das folhas foram preparados a partir da maceração dos tecidos das folhas até a consistência de um pó fino em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato 100mM (pH7,5), 1mM EDTA, 5mM DTT, 4% PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo as proteínas foi separado e estocado em -80°C. A concentração das proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando o reagente Bio-Rad protein detection reagent e BSA como padrão, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad Hercules, CA, USA).

5 - Ensaio da catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações. A atividade da CAT foi ensaiada em

espectrofotômetro a 25°C numa mistura de reação composta de 1mL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5), contendo 2,5µL de solução a 30% (v/v) de H₂O₂, preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 15µL de extrato vegetal e a atividade foi determinada pelo monitoramento da degradação do H₂O₂ a 240nm por 2 minutos contra um branco livre de extrato vegetal. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

6 - Ensaio da guaiacol peroxidase (GPX): A atividade da GPX foi determinada como descrito por Gomes Junior et al. (2006) com algumas modificações. O meio da reação foi composto de 250µL de tampão fosfato-citrato (0,2mM de fosfato de sódio dibásico : 0,1mM de ácido cítrico) pH 5,0, 0,06% de H₂O₂, 150 µL de extrato enzimático e 25 µL de guaiacol a 0,5% (v/v), que foi agitado com vórtex e colocado a 30°C por 15 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em banho de água e gelo, seguido da adição de 25µL de solução de metabissulfito de sódio a 2% (m/v). Após ser agitada, a mistura da reação foi mantida por 10 minutos e a atividade da GPX foi determinada pela leitura da absorbância a 450nm tendo como controle uma mistura isenta do extrato vegetal. A atividade da GPX foi expressa pela absorbância a 450nm/min⁻¹/mg de proteína. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

7 - Ensaio da superóxido desmutase (SOD): A eletroforese foi realizada em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida 9% para a atividade da SOD. Uma corrente constante de 30mA por gel foi aplicada por 3 horas a 4°C. Quantidades iguais de proteínas foram utilizadas para o carregamento dos géis. Foram aplicados nos géis 20µg.mL⁻¹ de proteína total solúvel do extrato de folha. Revelaram-se os géis pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971). Colocou-se o gel em solução contendo riboflavina 0,005% (p/v), 1mM Na₂EDTA, 3% de TEMED e 0,1mM NBT em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,8, permanecendo incubado a 37°C durante 30 min no escuro com agitação constante. Após coloração, o gel foi lavado com água deionizada, fixado com ácido acético 7% para paralisar a reação, e mantido na luz para revelação. Posteriormente foi fotodocumentado. Foram feitos 5 géis com as mesmas amostras para determinação da atividade da SOD porém somente um foi fotodocumentado.

8 - Ensaio da Ascorbato peroxidase (APX): A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Assada (1981) pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290nm a 30 C. O meio de reação continha 50mM de tampão fosfato, pH7.0, 0.5mM ascorbato, 0.1mM EDTA, 0.1mM H₂O₂ e 40µl do extrato enzimático em 1mL de volume final. A reação foi iniciada com a adição do ascorbato. Como controle foi utilizada uma mesma mistura de reação porém sem o extrato vegetal. O decréscimo da absorbância foi monitorado a partir de 10 até 180 segundos do início da reação. atividade foi determinada pelo monitoramento da degradação do ascorbato a 290nm por 2 minutos contra um branco livre de extrato vegetal. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

9 - Atividade das quitinases: Para a determinação da atividade da quitinase nas folhas de cafeeiro foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilquitina-remazol violeta brilhante (CM-Chitin-RBV 2mg/mL, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com Wirth e Wolf (1990) e com procedimento descrito por Guzzo e Martins (1996). Foram utilizados 50µL de extrato protéico, acrescidos de 250 µL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5.0 e 100 µL de substrato. A mistura foi incubada a 38°C por 2 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 2N e resfriado no gelo por 10 min. O substrato insolúvel não hidrolisado foi removido por centrifugação durante 5 min a 10.000g. A absorbância foi determinada por espectrofotometria a 550nm utilizando como referência uma mistura de reação sem o extrato foliar. A atividade enzimática foi expressa como absorbância a 550nm obtida para cada extrato dividida pela concentração protéica presente na mistura de reação. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

10 - Atividade das glucanases: Para a determinação da atividade da glucanase o procedimento foi similar. O substrato utilizado foi uma solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4mg/mL, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com Wirth & Wolf (1990) e com procedimento descrito por Guzzo e Martins (1996). Foram utilizados 50µL de extrato protéico, acrescidos de 600 µL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5.0 e 50 µL de substrato. A mistura foi incubada a 40°C por 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 2N e resfriado no gelo por 10 min. O substrato insolúvel não hidrolisado foi removido por centrifugação durante 5 min a 10.000g. A absorbância foi determinada por espectrofotometria a 600nm utilizando como

referência uma mistura de reação sem o extrato foliar. A atividade enzimática foi expressa como absorbância a 600nm obtida para cada extrato dividida pela concentração protéica presente na mistura de reação. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

11 - Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL): A atividade da PAL foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Umesha, 2006). A reação continha 100 µL do extrato protéico misturado com 400 µL do tampão Tris HCl 25mM pH 8.8 e com 500 µL de L-fenilalanina (50mM em tampão Tris HCl 25mM, pH 8.8), a qual foi incubada por 2h a 40°C. A reação foi interrompida pela adição de 60 µL de HCl 2N. A absorbância das amostras foi determinada a 290nm, tendo como controle 900 µL tampão de extração e 100 µL do extrato protéico. A atividade da PAL foi expressa com atividade específica pela absorbância a 290nm/min⁻¹/mg de proteína. Foram realizadas cinco determinações para cada amostra.

12 - Análises estatísticas: Para cada atividade enzimática testada, foram realizadas três determinações para cada extrato foliar, tendo sido preparados 5 extratos por tratamento/tempo de coleta. Os resultados obtidos das atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F (Teste de Tukey) através do programa ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA e AZEVEDO, 2002; SILVA e AZEVEDO 2006). A interação entre os fatores quando significativo foi desdobrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO

A1 Atividade da CAT

A análise de variância mostrou que houve diferença significativa nas interações dos parâmetros analisados (Variedade, dose e tempo de coleta) ao nível de 5% de significância (Apêndice A). A atividade da CAT em plantas de cafeeiro da variedade resistente (Obatã) foi menor em todos os tempos quando comparadas às plantas de cafeeiro da variedade suscetível (Mundo Novo). Quando desdobradas as análises, a estatística mostrou que na variedade suscetível (Mundo Novo) houve diferença significativa tanto para as doses quanto para os diferentes tempos de coleta (gráfico 5). Houve uma resposta mais rápida na ativação da enzima nas primeiras 24 horas após a inoculação do patógeno em plantas tratadas com Si, enquanto que nas plantas não tratadas houve um aumento da atividade enzimática somente às 96 horas após a inoculação.

Quando analisadas isoladas as plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), as análises estatísticas revelaram que não houve diferenças estatísticas entre as doses de Si aplicadas (gráfico 6). Houve um discreto aumento da atividade da CAT às 96 horas após a inoculação em plantas não tratadas.

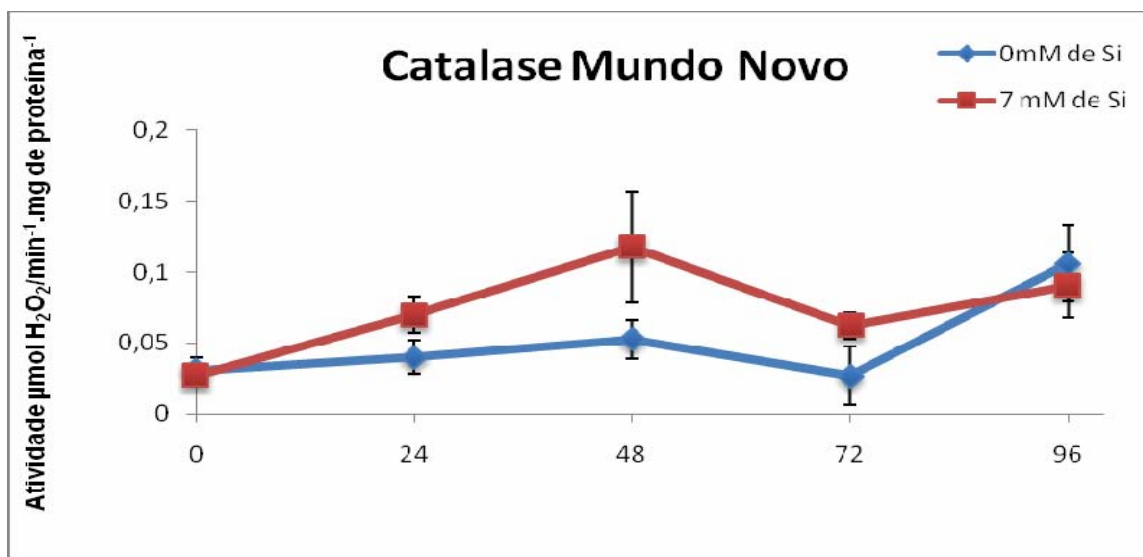


Gráfico 5. Atividade da CAT em folhas de café Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

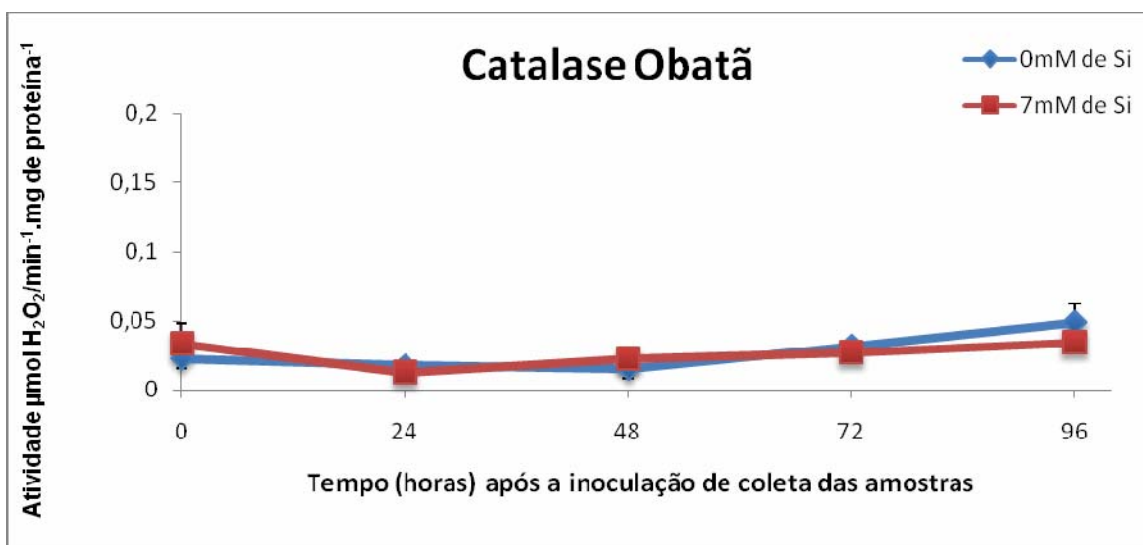


Gráfico 6. Atividade da CAT em folhas de café "Obatã" analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

Poucos são os trabalhos que relatam a atividade da CAT em resposta aos estímulos bióticos em plantas tratadas com Si. Em plantas de pimentão tratadas com silicato de potássio e submetidas ao estresse salino, a atividade da CAT também aumentou (TONIN et al., 2007). Em uma reação incompatível, durante a resposta da planta ao ataque do patógeno, a atividade da APX e da CAT é suprimida pelos hormônios ácido salicílico (AS)

e óxido nítrico (ON) no local da infecção (KLESSIG et al. 2000). Portanto a planta simultaneamente produz mais ERO's e ao mesmo tempo diminui sua capacidade de limpar o H_2O_2 , resultando em uma super acumulação de ERO's ativando a morte celular programada e portanto limitando o espalhamento da doença no sítio de infecção. O papel das ERO's durante a morte celular programada parece no entanto ser oposta ao papel desempenhado por elas durante o estresse abiótico natural onde as ERO's induzem uma maior atividade das enzimas que as degradam como as APX e CAT que diminuem o nível de ERO's celular.

O ácido salicílico bloqueia a atividade da catalase, provocando o acúmulo de H_2O_2 , o qual ativa o acúmulo das proteínas relacionadas com a patogênese e das fitoalexinas. No caso da catalase não ser bloqueada, não é observado o acúmulo de H_2O_2 , verificando-se uma reação compatível. Deste modo, a presença das catalases inibe a reação de hipersensibilidade em função de impedir o acúmulo de H_2O_2 o qual serve como um sinal para a produção e acúmulo das proteínas relacionadas com a patogênese e das fitoalexinas.

A2 Atividade da GPX

A diferença estatística apontada pela análise de variância nas interações dos parâmetros analisados (Variedade, dose e tempo de coleta) foi significativa ao nível de 5% de significância (Apêndice B). Desdobrando as análises, a estatística apontou que na variedade suscetível (Mundo Novo) houve diferença significativa entre as doses em todos os tempos de coleta (Gráfico 7). Interessantemente a atividade da GPX foi menor em plantas tratadas com Si. Em plantas tratadas não houve diferença estatística nos diferentes tempos de coleta, enquanto que em plantas não tratadas a atividade da GPX caiu às 96 horas após a inoculação em relação às plantas controle. Porém em plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), as análises estatísticas revelaram que houve diferença estatística entre as doses de Si aplicadas (Gráfico 8). Em plantas tratadas, a atividade nas primeiras 72 horas foi maior que em plantas não tratadas. Houve uma discreta diminuição da atividade da GPX às 96 horas após a inoculação em plantas não tratadas. A atividade da GPX em plantas resistentes é menor que a atividade em plantas suscetíveis.

As peroxidases são enzimas muito versáteis que participam de vários processos metabólicos como regulação hormonal, diferenciação celular, biossíntese de lignina e respostas gerais de estresses entre outros (SIEGEL, 1993). Guo et al. (2007), trabalhando com melões verificou que quando aplicado silicato de sódio, a atividade da peroxidase era

aproximadamente 100% maior que nas plantas controle. Já no tratamento com oxido de Si a atividade da peroxidase diminuiu em relação às plantas controle. O aumento da atividade da GPX no tratamento com silicato de sódio pode ser devido a alta concentração de sódio proveniente da fonte de Si, o que pode ter causado um estresse salino significativo na planta.

Nojosa (2003) estudando cafeeiros inoculados com *H. vastatrix* e tratados com silicato de potássio verificou que a atividade da GPX era maior em plantas tratadas e inoculadas. Verificou também que quando aplicado o composto BTH, a atividade das GPX era maior mesmo quando as plantas não eram submetidas à inoculação. Mais uma vez prova-se que o composto BTH age estimulando as respostas antes mesmo da presença do patógeno, o que pode causar um custo energético desnecessário para a planta, enquanto que plantas tratadas com Si somente respondem na presença do patógeno.

Alguns autores também já relataram o aumento da atividade da GPX nos processos de infecção ou indução de resistência contra patógenos (RESENDE et al., 2002; FLOOT; MOERSCHBACHER; REISENER, 1989) Mazzafera; Gonçalves e Fernandes (1989) estudando o patossistema café-*Meloidogyne incognita* puderam demonstrar que a atividade da peroxidase foi maior em tecidos infectados. Deste modo, em cafeeiro, assim como outras culturas, a atividade da peroxidase é acrescida por diferentes estímulos como infecção por nematóides, patógenos fungicos, indutores de resistência (como o BTH) (RESENDE et al., 2002; REUVENI; DOR; REUVENI, 1998).

Neste estudo, as plantas de cafeeiro suscetíveis não apresentaram aumento da atividade da GPX, porém houve diminuição dos sintomas da ferrugem. Este resultado sugere duas hipóteses: A GPX não está envolvida no processo de defesa a ferrugem em plantas de cafeeiros, ou sua inibição ou atividade diminuída em relação ao controle seja intencional nos processos de defesa.

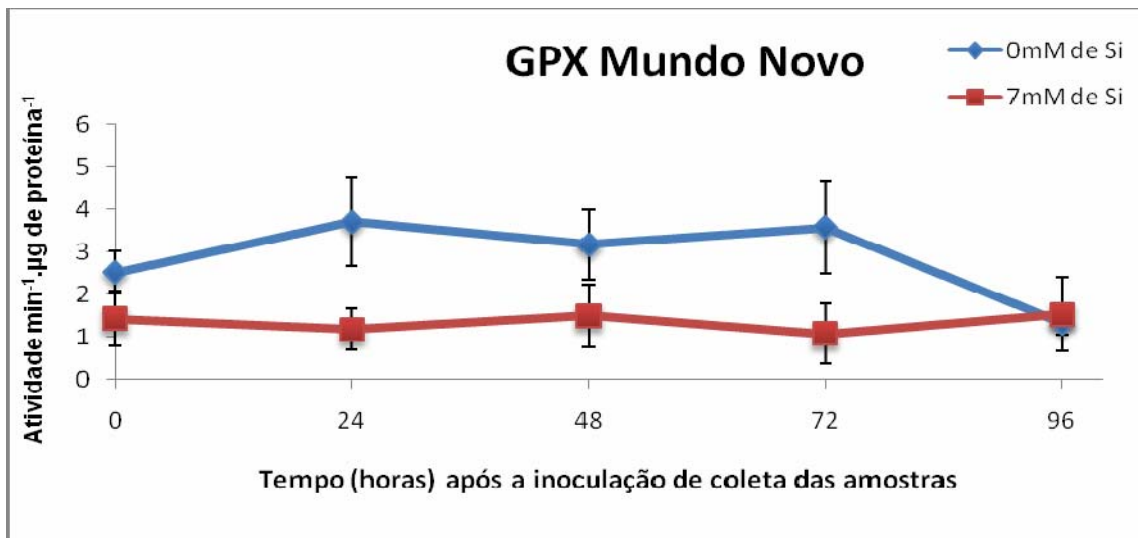


Gráfico 7. Atividade da GPX em folhas de café cv. Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

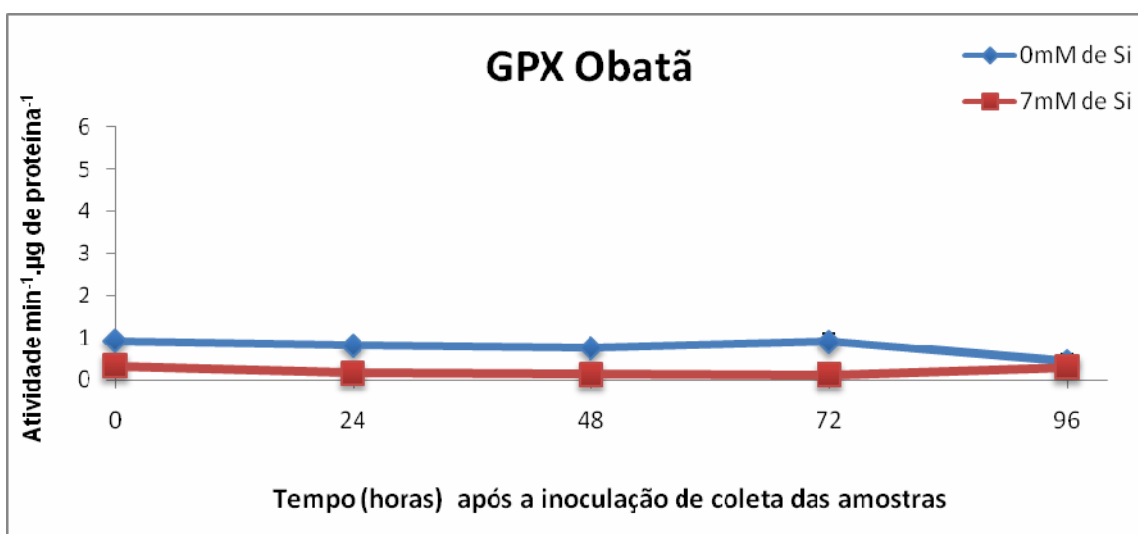


Gráfico 8. Atividade da GPX em folhas de café cv. Obatã analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

A3 Atividade da APX

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa nas interações dos parâmetros analisados (Variedade, dose e tempo de coleta) ao nível de 5% de significância (Apêndice C). Porém, quando desdobradas as análises, a estatística mostrou que na variedade suscetível (Mundo Novo) houve diferença significativa tanto para as doses quanto para os diferentes tempos de coleta (Gráfico 9). Mesmo nas plantas controle a atividade da APX foi maior nas plantas tratadas. Nas plantas sem Si houve um aumento da atividade enzimática somente às 96 horas após a inoculação.

Em plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), as análises estatísticas revelaram que não houve diferenças estatísticas entre as doses de Si aplicadas (Gráfico 10). No entanto houve um aumento da atividade da APX às 96 horas após a inoculação em plantas tratadas. Como em todas as outras enzimas analisadas, a atividade da APX também foi menor nas plantas resistentes.

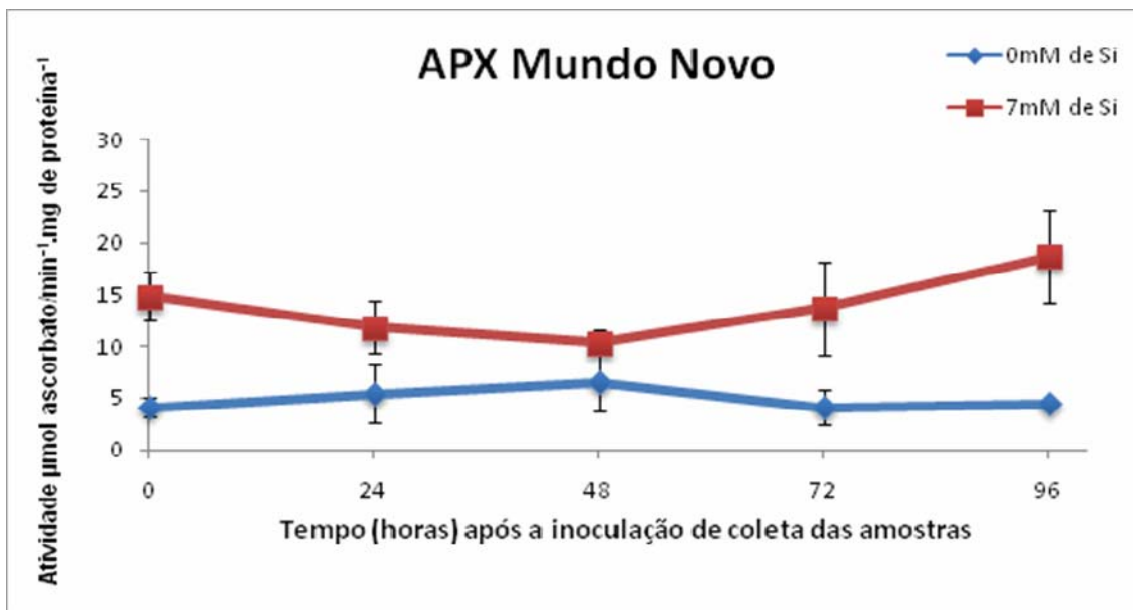


Gráfico 9. Atividade da APX em folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

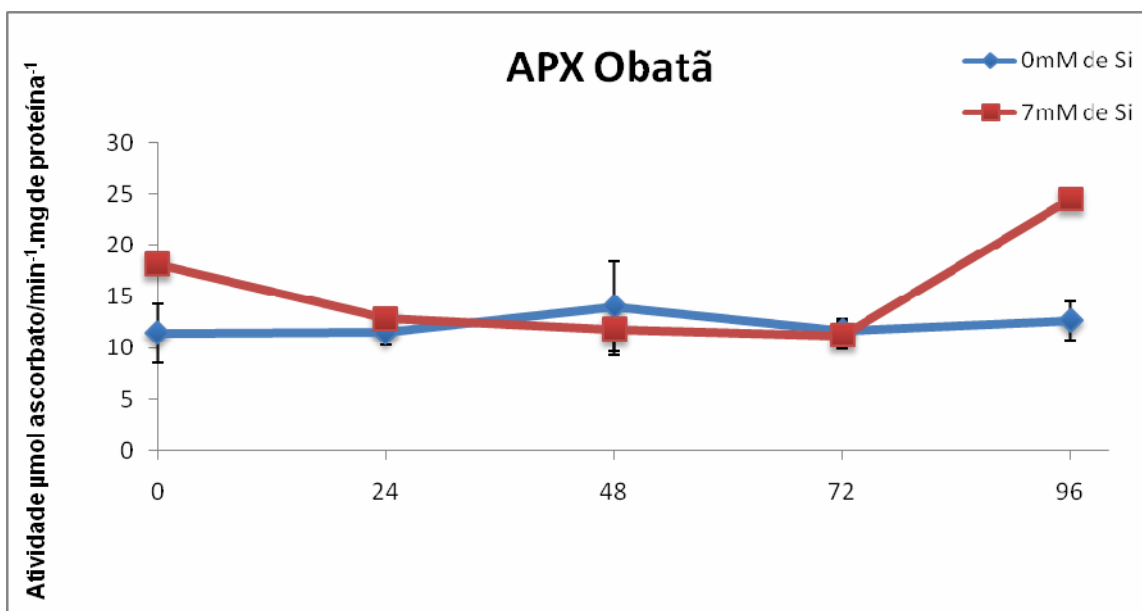


Gráfico 10. Atividade da APX em folhas de cafeeiro cv. Obatã analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

A4 Atividade da SOD

Quando comparadas ambas as cultivares, pode-se notar que a atividade da SOD foi maior nas plantas de cafeeiros suscetíveis (Mundo Novo) que nas plantas resistentes (Obatã). Quando analisadas cada variedade separadamente, os perfis protéicos nos géis de poliacrilamida revelam que nas plantas suscetíveis (Mundo Novo) controle, ou seja, no tempo zero (sem inoculação com o patógeno), as plantas não tratadas aparentemente apresentam atividade da SOD maior que plantas tratadas. Houve um aumento da atividade da SOD nas plantas suscetíveis após a inoculação com o patógeno tanto em plantas tratadas com em plantas não tratadas com Si. A atividade das plantas tratadas foi maior somente no tempo de 48 horas após a inoculação. Em todos os outros tempos a atividade da SOD foi maior em plantas não tratadas. Houve uma queda da atividade a partir de 72 horas após a inoculação em plantas tratadas.

Em plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), a atividade da SOD não diferiu em plantas tratadas e não tratadas. Pôde-se notar um ligeiro aumento da atividade as 96 horas após a inoculação com o patógeno.

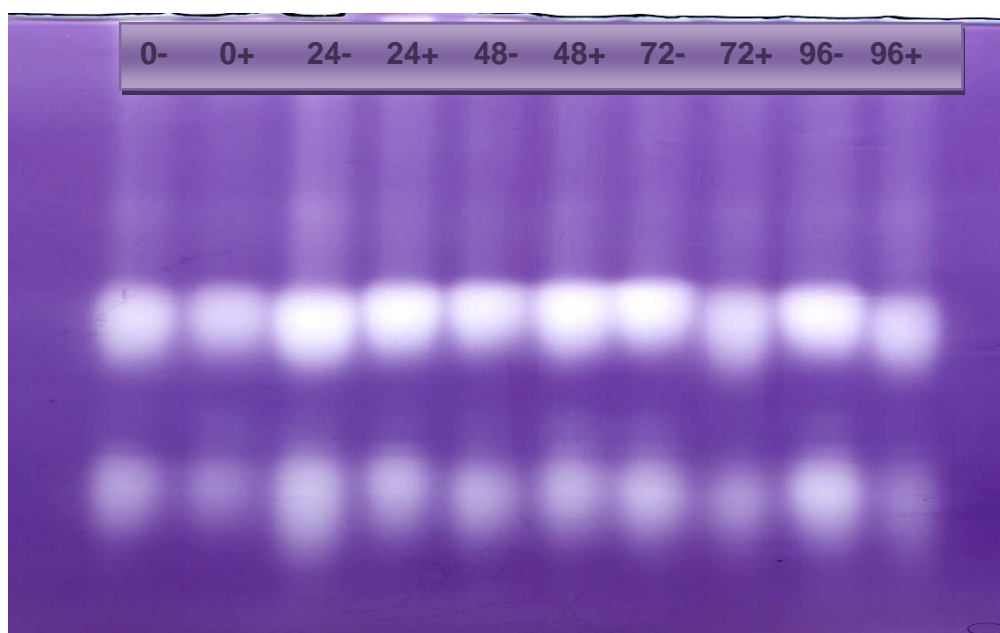


Figura 1. Perfil de isoenzimas de SOD em folhas de cafeeiros suscetíveis à ferrugem (cv. Mundo Novo). Cada perfil está indicado com um número – que corresponde ao tempo de coleta das folhas após a inoculação com o patógeno- e com sinais de (-) e (+) onde (-) significa sem a adição de Si – plantas não tratadas- e (+) adição de Si – plantas tratadas.

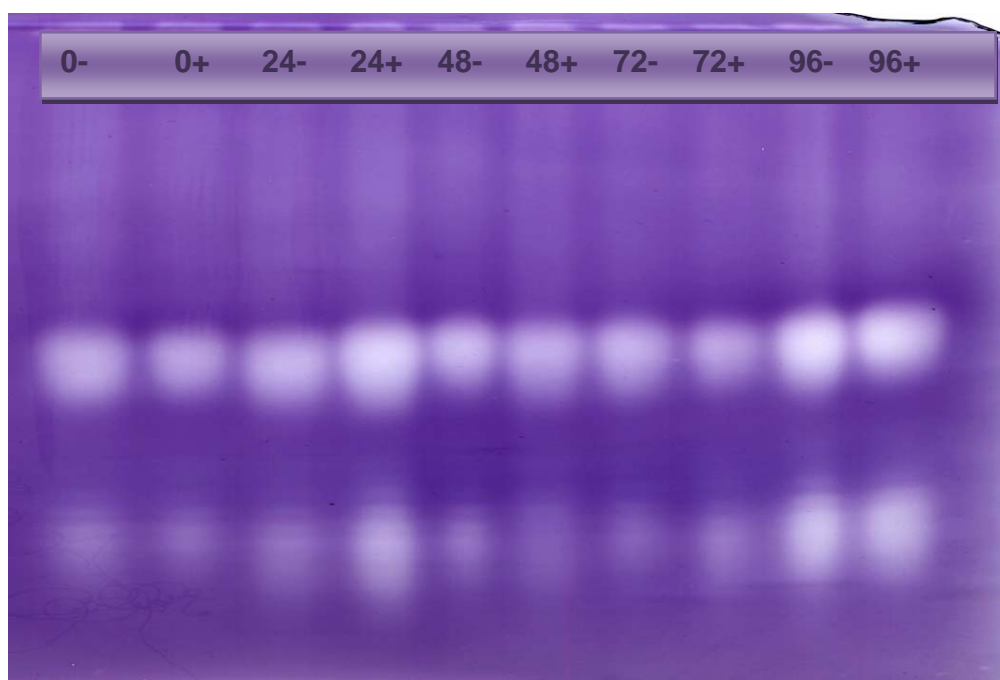


Figura 2. Perfil de isoenzimas de SOD em folhas de cafeeiros resistentes à ferrugem (cv. Obatã). Cada perfil está indicado com um número, que corresponde ao tempo de coleta das folhas após a inoculação com o patógeno, e com sinais de (-) e (+) onde (-) significa sem a adição de Si – plantas não tratadas- e (+) adição de Si – plantas tratadas.

Em plantas de pimentão submetidas ao estresse salino e tratadas com silicato também houve um aumento da atividade da SOD quando comparadas às plantas não tratadas (TONIN et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (ERO's) foram inicialmente reconhecidas como sendo tóxicas. Nos últimos anos, estudos revelaram que as ERO's desempenham um papel importante na sinalização em plantas controlando processos como crescimento, desenvolvimento, e respostas a estresse bióticos e abióticos e também na morte celular programada. As ERO's se formam naturalmente no interior celular, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxisomas, como produtos secundários oriundos da fotossíntese e respiração (APEL & HIRT, 2004). Entretanto, são produzidas em excesso logo após o reconhecimento de um patógeno pela planta (TORRES & DANGL, 2005).

Geralmente as ERO's podem afetar as respostas de defesa de duas maneiras: Podem reagir com uma grande variedade de biomoléculas e portanto causar a necrose de alguns tecidos das plantas ou pode influenciar a expressão de uma grande gama de genes e também agir na via transdução de sinais (APEL & HIRT, 2004).

O dano oxidativo no tecido da planta causado pelas ERO's é aliviado ou prevenido pela ação combinada de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Estes mecanismos incluem b-carotenos, tocoferol, ascorbato, glutathione e enzimas com atividade antioxidativa, tais como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione peroxidase e glutathione redutase (GR) (FOYER & NOCTOR, 2005; MAFFEI et al., 2006).

As SOD's são a primeira linha de defesa contra danos provocados pelas ERO's nas células e são catalisadoras da dismutação do O_2^- e HO_2^+ a H_2O_2 . São as únicas enzimas que interferem nas concentrações de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos que originam o radical OH (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). As catalases são enzimas que convertem o H_2O_2 gerados pela SOD em H_2O e O_2 . São as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas. Presume-se que devido à elevação do peróxido de hidrogênio gerada pela ação da SOD, houve um aumento da atividade da CAT. Na presença de Si, as plantas de cafeeiros suscetíveis se tornam mais eficientes na redução de formas reativas de oxigênio.

Em plantas resistentes como não há um aumento da atividade da SOD, portanto não há grande geração de H_2O_2 , é de se esperar que as atividades das outras enzimas degradadoras de ERO's também sejam menores.

A produção de APX é regulada pós-transcricionalmente e a lipoxigenase (LOX) e a CAT regulada no nível do mRNA, ou seja transcricionalmente (ROJAS; GÓMEZ; OCAMPO, 1993). Talvez, o fato de serem reguladas em níveis diferentes da transcrição, explique o fato da diferença de perfil na atividade da APX em plantas de cafeeiro.

A atividade das enzimas pode variar, para mais ou para menos, de acordo com a interação hospedeiro-patógeno que se está estudando. Barreto (2005) estudando a interação feijão - *Colletotrichum lindemuthianum*, pôde perceber que as atividades das enzimas peroxidase, glucanase, superóxido dismutase, catalase e fenilalanina amônia-liase, medidas no curso da infecção pelo fungo, mostraram-se superiores no genótipo resistente em comparação com o suscetível. Estes dados indicam que estas enzimas podem estar relacionadas com a defesa do feijão caupi ao *Colletotrichum lindemuthianum*.

Outras enzimas também estão envolvidas na resistência das plantas de cafeeiro contra o fungo causador da ferrugem. A polifenoloxidase (PPO) e a lipoxigenase (LOX) também foram relatadas (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006; ROJAS; GÓMEZ; OCAMPO, 1993) Em plantas suscetíveis a atividade da PPO manteve-se estável mesmo quando as plantas foram submetidas a estresses bióticos (inoculação com o fungo) e abióticos (danos mecânicos) Em plantas resistentes à ferrugem a atividade da PPO aumentou nas mesmas condições analisadas (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006). Plantas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem e inoculadas com o fungo não apresentaram diferenças na atividade da LOX quando comparadas às plantas controle (ROJAS; GÓMEZ; OCAMPO, 1993). No entanto nas plantas resistentes, a atividade da LOX aumentou quase 340%. Estes dois trabalhos foram feitos com cultivares suscetíveis e resistentes de cafeeiro e submetidas à inoculação com *Hemileia vastatrix*. Os dados mostram que a variedade resistente responde de um modo diferente, aumentando a atividade destas enzimas enquanto que não há mudança alguma na variedade suscetível.

Em contrapartida, no mesmo estudo de Melo; Shimizu & Mazzafera (2006) foi testada a atividade da PPO em plantas de cafeeiro suscetíveis e resistentes porém contra o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*). Neste caso não houve alteração da atividade da PPO sugerindo que esta enzima não está envolvida nos processos de defesa contra o bicho-mineiro.

Os diferentes estímulos podem gerar ERO's quimicamente diferentes e até mesmo serem geradas em compartimentos celulares diferentes (ELSTNER, 1991; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002). Por conta disso, a atividade biológica das ERO's exibe um alto grau de seletividade e especificidade devido à sua identidade química ou de qual compartimento foram gerados. Por exemplo, em plantas de trigo mantidas em uma solução com alta concentração de boro sem adição de Si, a atividade da SOD, CAT e APX foram maiores que em plantas de trigos tratadas com Si (GUNES et al., 2007b). O mesmo ocorreu com plantas de cevada mantidas em solo com alta concentração de boro (Gunes et al., 2007). Esta situação expressa as diferenças na atividade dessas enzimas de acordo com o estímulo a que a planta é submetida. Neste caso o Si agiu com um fator atenuante da toxicidade do boro em plantas de trigo e o autor sugere a suplementação com Si em solos onde há altas concentrações deste elemento.

Em suma:

- Em plantas resistentes a atividade das enzimas SOD, CAT e GPX é menor que em plantas suscetíveis concordando com vários estudos onde é relatada esta diminuição;
- O Si age estimulando a atividade das enzimas SOD, CAT e APX em plantas suscetíveis ativando uma resposta mais rápida;
- O Si parece não possuir nenhum efeito sobre a atividade da SOD, CAT e GPX em plantas resistentes;

O papel do Si na resistência das plantas pela análise das principais enzimas responsáveis pela destoxificação das ERO's ainda não é bem definido. Como as atividades nas plantas suscetíveis e tratadas são maiores que plantas não tratadas, não se pode afirmar que o Si age como um mensageiro secundário estimulando a produção de ácido salicílico (AS) e óxido nítrico (ON) ou age diretamente como o AS e ON. Pois se assim fosse, as atividades destas enzimas estariam diminuídas e não aumentadas como foram apresentadas neste estudo.

O fato de algumas enzimas estarem diminuídas em plantas resistentes pode ser devido a sua supressão pelo AS e OX formados durante o processo de defesa destas plantas. Durante os mecanismos de defesa há gasto de energia e portanto alguns genes são reprimidos durante este processo para melhor utilização da energia para impedir o desenvolvimento da doença. Talvez as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo estejam ligadas de modo indireto com a resistência à ferrugem em plantas de cafeeiro.

Nossos resultados sugerem que a atividade das enzimas analisadas é derivada do tecido da planta e não do patógeno. Essa conclusão foi feita a partir da ausência de aumento na atividade nas reações compatíveis em que os sintomas puderam ser visualizados e, portanto houve penetração do fungo.

B ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA

B1 Atividade da quitinase

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa nas interações dos parâmetros analisados (Variedade, dose e tempo de coleta). No entanto a atividade da quitinase foi menor em plantas de cafeeiro resistentes (Obatã) (Apêndice D). Quando desdobradas as análises, a estatística mostrou que na variedade suscetível (Mundo Novo) houve diferença significativa tanto para as doses quanto para os diferentes tempos de coleta (Gráfico 11). Houve uma resposta mais rápida na ativação da enzima no tempo de 96 horas após a inoculação do patógeno em plantas tratadas com Si, enquanto que nas plantas não tratadas esse aumento não foi observado. Quando analisadas isoladas as plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), as análises estatísticas revelaram que não houve diferenças estatísticas entre as doses de Si aplicadas (Gráfico 12).

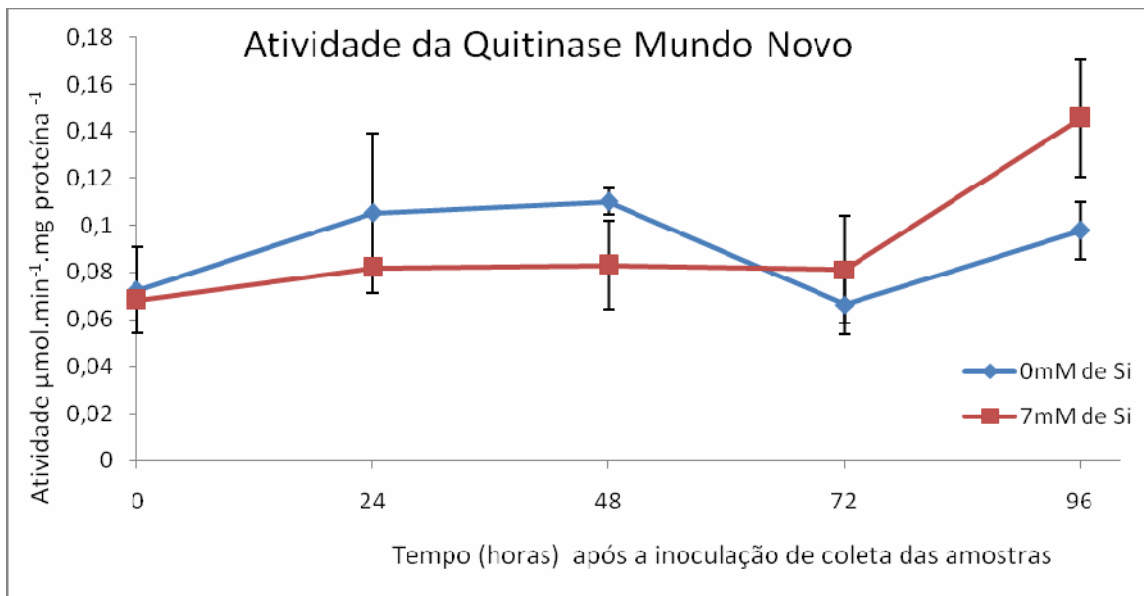


Gráfico 11. Atividade da quitinase em folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

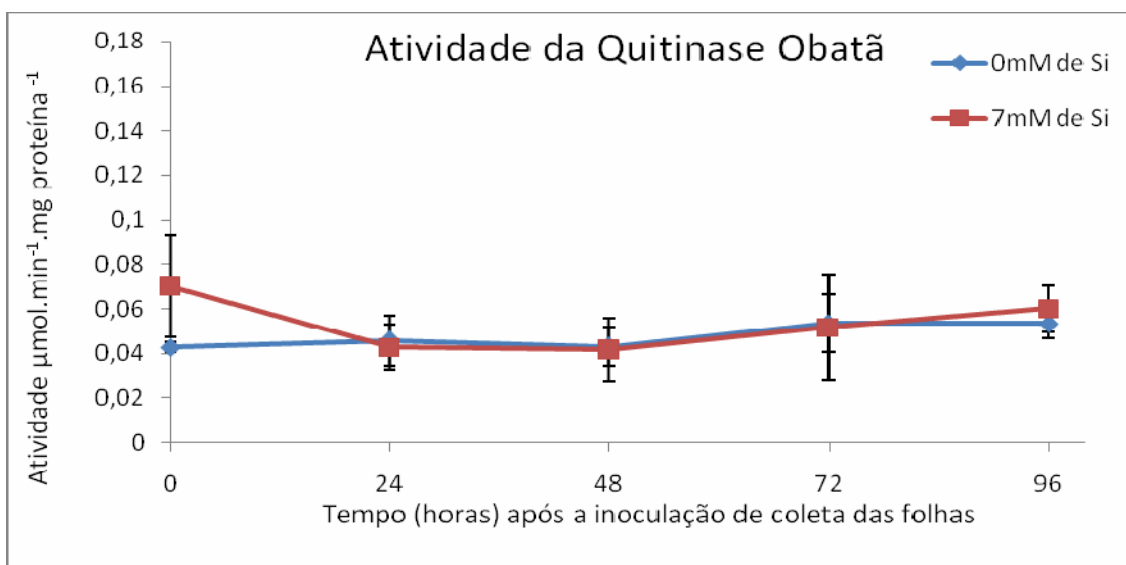


Gráfico 12. Atividade da quitinase em folhas de cafeeiro cv. Obatã analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

B2 Atividade da glucanase

A diferença estatística apontada pela análise de variância nas interações dos parâmetros analisados (Variedade, dose e tempo de coleta) foi significativa ao nível de 5% de significância (Apêndice E). A atividade da glucanase foi menor e mais estável nas plantas resistentes (Obatã). Desdobrando as análises, a estatística apontou que na variedade suscetível (Mundo Novo) houve diferença significativa entre as doses no tempo de 96 horas após a inoculação com o patógeno (Gráfico 13). Enquanto que as plantas de cafeeiro resistentes (Obatã), não houve diferenças estatísticas significativa entre as doses de Si aplicadas (Gráfico 14).

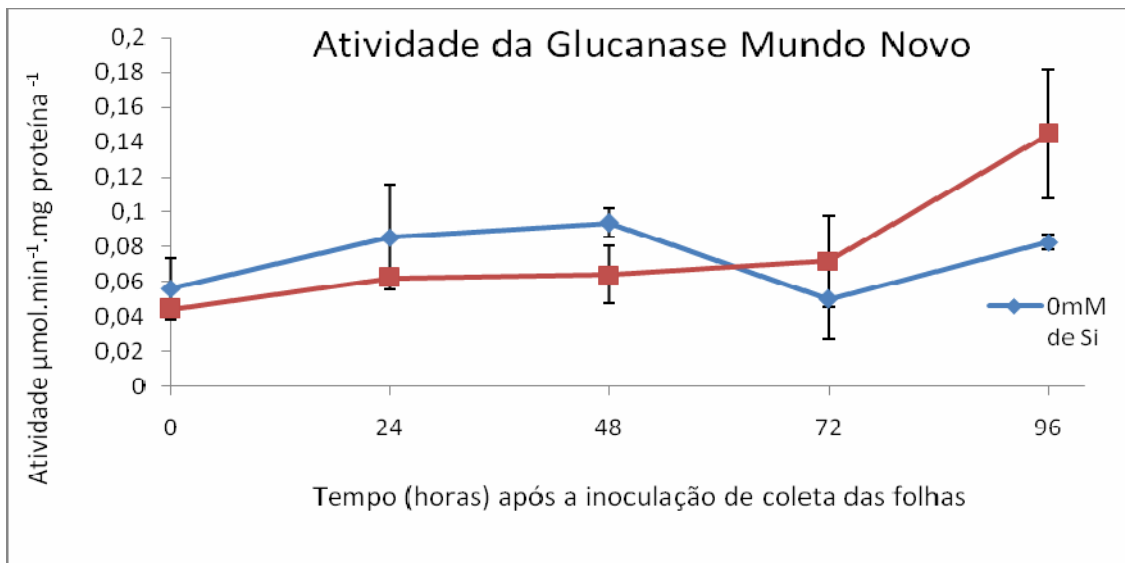


Gráfico 13. Atividade da glucanase em folhas de café cv. Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

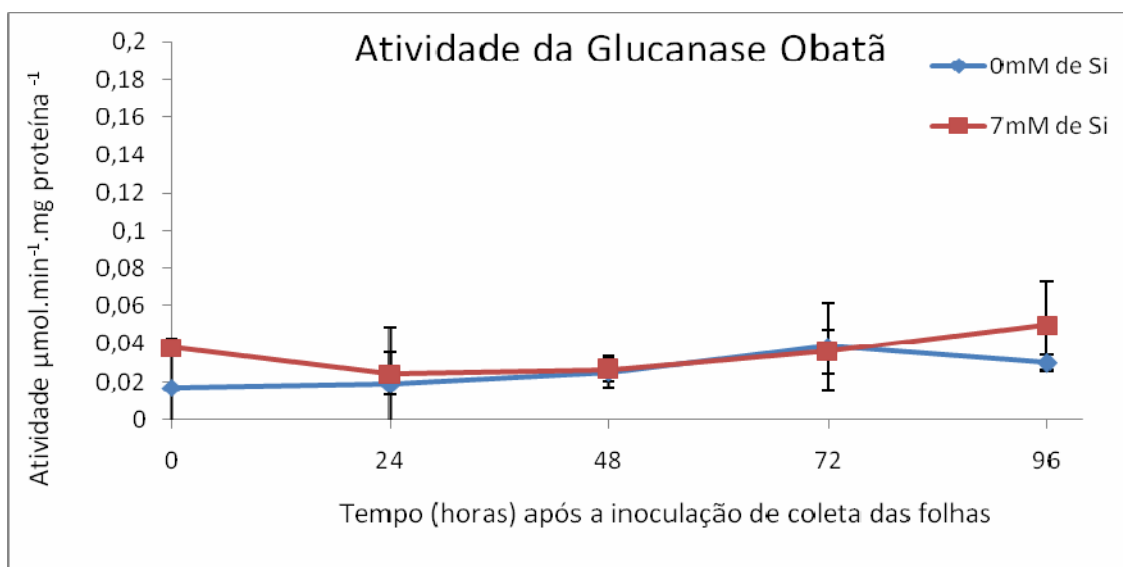


Gráfico 14. Atividade da glucanase em folhas de café cv. Obatã analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

B3 Atividade da PAL

Os resultados das análises estatísticas apontam que a interação entre os parâmetros analisados (cultivar, dose e tempo de coleta) foi significativa ao nível de 5% de significância (Apêndice F). Quando desdobradas as análises, foi possível verificar que a atividade da PAL em plantas suscetíveis tratadas com Si teve dois picos de aumento as 24 e 72 horas após a inoculação com o patógeno (Gráfico 15), enquanto que em plantas não tratadas sua atividade permaneceu inalterada. Em plantas de cafeeiro resistentes (Obatã) a atividade da PAL não sofreu nenhuma alteração com a adição de Si.

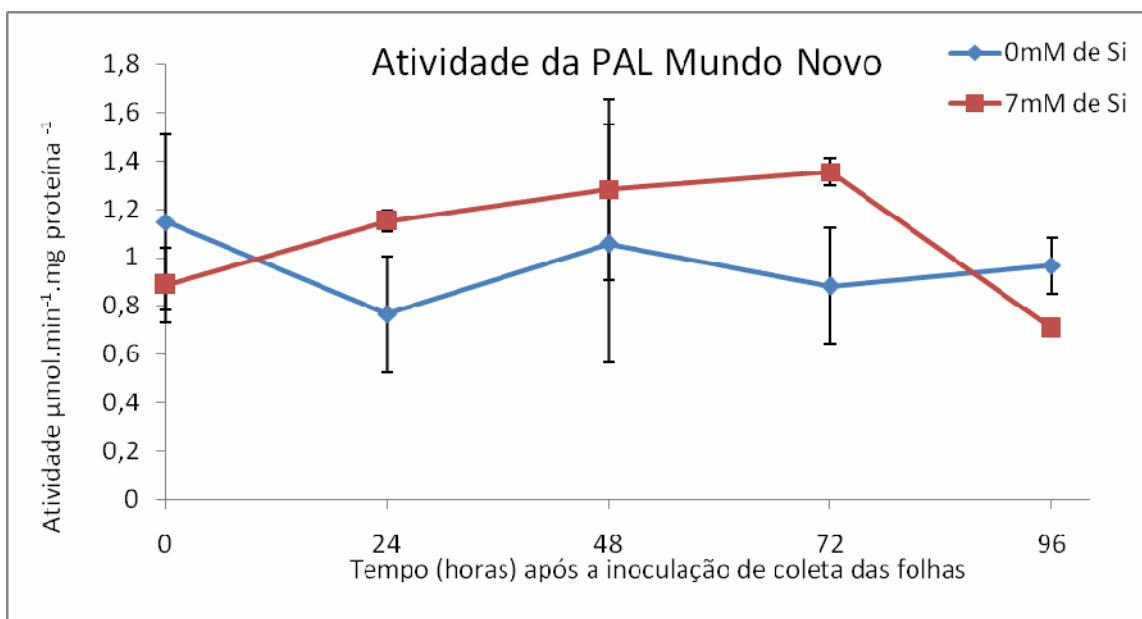


Gráfico 15. Atividade da PAL em folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

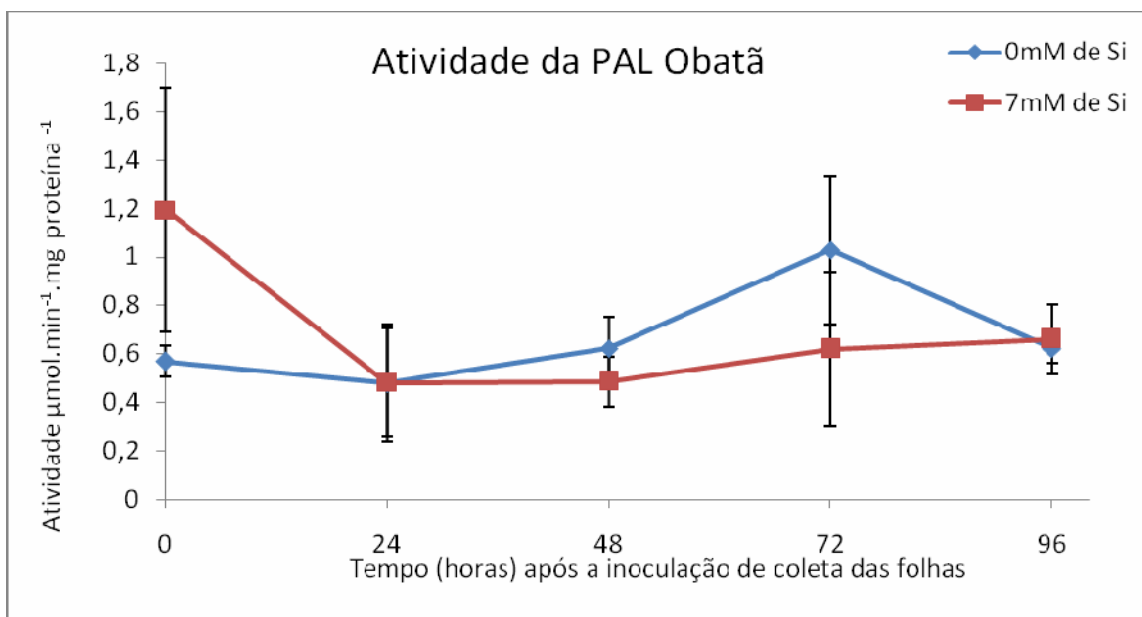


Gráfico 16. Atividade da PAL em folhas de cafeeiro cv. Obatã analisadas em diferentes tempos de coleta após a inoculação com o patógeno.

A atividade das proteínas quitinase, glucanase e PAL aumentou, em plantas de café suscetíveis e tratadas. Quitinases e glucanases tiveram suas atividades aumentadas no tempo de 96 horas após a inoculação com o fungo e a PAL apresentou dois picos as 24 e 72 horas após a inoculação. A atividade destas enzimas, no entanto, não sofreu alteração nenhuma em plantas de cafeeiros resistentes, sejam elas tratadas ou não.

Como em plantas de cafeeiros suscetíveis, a atividade da PPO não se modificou nem com a inoculação do patógeno, o aumento significativo das enzimas aqui citadas pode ser devido à suplementação com Si.

Após a germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix* a hifa penetra na folha pela abertura do estômato. Sob ótimas condições uma ramificação do micélio se forma entre os espaços intercelulares das células mesofilicas 96 horas após a inoculação e ocorre a ruptura das células das plantas suscetíveis (COUTINHO; RIJKENBERG; VANASCH, 1993). Por outro lado, em plantas resistentes o crescimento do fungo não passa da formação do haustório (SILVA et al., 2002). Estudos com plantas de cafeeiros suscetíveis e resistentes à ferrugem mostraram que a germinação do urediniósporo bem como a diferenciação do apressório no estômato não difere significativamente nas duas plantas. Porém o crescimento do fungo (comprimento da hifa e números de haustórios por sítio de infecção) foi significativamente maior em plantas suscetíveis (SILVA et al., 2002). Nas plantas resistentes o fungo cessa seu crescimento nos estágios primários do processo de infecção antes mesmo da formação do primeiro haustório (MARTINS; MORAES, 1996). O fato das enzimas tanto do estresse oxidativo com as enzimas relacionadas à defesa estarem distintas nas duas cultivares seja atribuído às diferentes etapas do desenvolvimento do fungo nestas plantas.

O experimento realizado mostrou que as plantas de cafeeiro suscetíveis mantidas em solução nutritiva contendo Si apresentaram aumento na atividade das enzimas quitinase e glucanase e PAL além de apresentaram menos sintomas da doença. O aumento da atividade de quitinases e glucanases também pôde ser verificado em plantas ervilhas que cresceram em solução nutritiva contendo silicato de potássio. Esse aumento foi reportado em 2 ou até 3 vezes maior do que plantas controle (DANN; MUIR, 2002).

Silva et al. (2002) observaram que a atividade da PAL em plantas de café resistente apresentou dois picos. O primeiro coincidiu com o começo da resposta de

hipersensibilidade e morte celular e o segundo pôde ser relacionado com a acumulação tardia de compostos fenólicos e lignificação da parede celular.

Em estudos com melões, Guo et al. (2007) verificaram que no tratamento das frutas com silicato de sódio, a atividade da PAL foi 26% maior quando comparadas às plantas controle enquanto que no tratamento com o óxido silícico sua atividade não foi modificadas em relação ao controle. Porém ambos os tratamentos foram eficazes na redução dos sintomas causados por *T. roseum* em melões.

As quitinases e glucanases atuam na defesa contra vários patógenos fungicos. Essas atividades são induzidas em muitas plantas em resposta à infecção e também em respostas à resistência induzida por elicitores. Quitinases e glucanases são enzimas líticas que possuem ação hidrolítica e agem sinergicamente na degradação da parede celular de muitos fungos. Isto sugere que a combinação destas duas enzimas pode inibir fortemente o crescimento de fungos mais do que a ação isolada das mesmas.

O acúmulo das PR proteínas em plantas é relacionada com a SAR. Quitinases e glucanases não somente hidrolisam a parede celular dos fungos como também liberam elicitores da parede do fungo que também estimulam as respostas de defesa das plantas.

Genes de defesa em cafeeiros, contra *H. vastatrix*, já foram isolados e identificados em plantas resistentes (FERNANDEZ et al., 2004; GUZZO et al., 2004). Estes estudos foram realizados em diferentes tempos após a inoculação do fungo e os dois podem demonstrar que a expressão dos genes ocorre nos estágios primários da infecção até mais ou menos 96 horas após. Estes genes também foram identificados em plantas suscetíveis tratadas com o elicitador abiótico BTH mostrando que as mesmas são capazes de reagir quando estimuladas.

O acúmulo e síntese em tecidos vegetais de hidrolases tais como, β -1,3-glucanases e quitinases, tem sido freqüentemente associados aos mecanismos de defesa de plantas a doenças, uma vez que podem ser desencadeados por patógenos, metabolitos provenientes de microrganismos ou substâncias químicas que agem como indutores de resistência (KOMBRINK; HALBROCK, 1986; ROULIN; BUCHALA, 1995). Em plantas de pepino, fumo e café, a resistência induzida contra *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. & Halst., *Peronospora tabacina* Adam e *Hemileia vastatrix* Berkeley et Broome, respectivamente, foi correlacionada ao aumento da atividade de β -1,3-glucanases e quitinases (MÉTRAUX & BOLLER, 1986; PAN; YE; KUC, 1991; GUZZO; MARTINS,

1996). Estas enzimas, presentes em plantas, catalisam, respectivamente, a hidrólise dos polímeros β -1,3-glucana e quitina, componentes principais das paredes celulares de muitos fungos. As quitinases podem também desempenhar uma atividade similar à lisoenzima e hidrolisar o peptídeoglicano presente nas paredes celulares de bactérias (FRITIG et al., 1998). Foi demonstrada a ação hidrolítica, *in vitro*, de β -1,3-glucanases e quitinases em paredes celulares de alguns fungos fitopatogênicos (MADAMANCHI & KUC, 1991).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o aumento da atividade das enzimas quitinase, glucanase e PAL está relacionado com a resistência induzida pelo Si em plantas de cafeeiro suscetíveis contra a ferrugem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B. et al. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, p. 129-134, 1971.

ALVAREZ, M. E. et al. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 1-20, 1998.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, Oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 109-116, 1989.

AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BARRETO, A. L. H. **Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Briosi & Cav.] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta**. 2005. 297 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 22, p. 87-108, 1968.

BEAUCHAMP, C. H.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.

BOLLER, T. et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, Berlin, v. 157, p. 22–31, 1983.

BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZE, D. Superoxide desmutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M.M . A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

COUTINHO, T. A.; RIJKENBERG, F. H. J.; VANASCH, M. A. J. Development of infection structures by *Hemileia vastatrix* in resistant and susceptible selections of *Coffea* and in *Phaseolus vulgaris*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1001-1008, 1993.

DANN, E. K.; MUIR, S. Peas growth in media with elevated plant-available silicon levels have higher activities of chitinase and β -1,3 glucanase, are less susceptible to a fungal leaf spot pathogen and accumulate more foliar silicon. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 31, p. 9-13, 2002.

DESIKAN, R. et al. Hairpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemistry Journal**, La Jolla, v. 330, p. 115-120, 1998.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. **Physiology and Plant Pathology**, London, v. 23, p. 345-347, 1983.

ELSTNER, E. F. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELLAND, E. J.; STEFFEN, K. L. (Ed.). **Active oxygen/oxidative stress in plant metabolites**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1991. p. 13-25.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 11-17, 1994.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

FERNANDEZ, D. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527-536, 2004.

FLOOT, B. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; REISENER, H. J. Peroxidase isoenzymes patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. **New Phytologist**, Cambridge, v. 111, n. 3, p. 413-421, 1989.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, p. 16-22, 1998.

GOMES JUNIOR, R. A. et al. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5, p. 420-429, 2006.

GUNES, A. et al. Silicon mediates changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 6, p. 807-811, 2007a.

GUNES, A. et al. Silicon increase boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil excess boron. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 3, p. 571-574, 2007b.

GUO, Y. et al. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, p. 1012-1018, 2007.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1-3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 449-454, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

KLESSIG, D. F. et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proceeding of National academic science USA**, Washington, v. 97, p. 8849-8855, 2000.

KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Response of cultured parsley cells to elicitors from phytopatogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, n. 1, p. 216-221, 1986.

KUC, J.; STROBEL, N. E. Induced resistance using pathogens and no pathogens. In: TJAMOS, E. S. (Ed.). **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p. 295–303.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

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

LIANG, Y. C.; DING, R. X. Influence of silicon on microdistribution of mineral ions in roots of salt-stresses barley as associated with salt tolerance in plants. **Science China**, Beijing, v. 45, p. 298-308, 2002.

LIANG, Y. C. et al. Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.19, p. 173-183, 1996.

MADAMANCHI, N. R.; KUC, J. Induced systemic resistance in plants. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 347-362.

MAFFEI, M. E. et al. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 3, p. 1022–1035, 2006.

MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 519-526, 1996.

MAUCH, F.; MAUCHI-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and glucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 936-942, 1988.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J. A. R. Fenóis, peroxidases e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 131-142, 1989.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, p. 277-285, 2006.

MÉTRAUX, J. P.; BOLLER, T. H. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, p. 161-169, 1986.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NEILL, N.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 388-395, 2002.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito dos indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. E *Phoma costarricensis* ECHANDI.** 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC, J. Association of β , 1-3 glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Pernospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. **Physiological and Plant Molecular Pathology**, London, v. 39, p. 25-39, 1991.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, St. Paul, v. 51, p. 621-628, 2002.

REUVENI, R.; DOR, G.; REUVENI, M. Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p. 703-709, 1998.

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**, London, v. 43, p. 209-219, 1993.

ROULIN, S.; BUCHALA, A. J. The induction of β , 1-3 glucanase and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 471-489, 1995.

SCHLUMBAUM, A. et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v. 324, p. 365-367, 1986.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, 1993.

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6., 1996, Cancun. **Proceedings...** Cancun: ASAE, 1996. p. 294-298.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRES ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings...** Orlando: ASAE, 2006. p. 393-396.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the Orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistance coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 169-183, 2002.

TONIN, F. B.; LEORNARDO, M.; BROETTO, F. Silicato de cálcio na atividade enzimática e produção de pimentão em plantas submetidas ao estresse salino. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SILÍCIO NA AGRICULTURA, 4., 2007, Botucatu. Botucatu: UNESP, 2007. p. 259.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 397-403, 2005.

WESSELS, J. G. H.; SIETSMA, J. H. Fungal cell wall: a survey. In: TANNER, W.; LOEWUS, F.A. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. N. Ser. II. Plant carbohydrates. Berlin: Springer Verlag, 1981. v. 13B, p. 352-394.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, p. 197-205, 1990.

YOUNG, D. H.; PEGG, G. F. The action of tomato and *Verticillium albo-atrum* glycosidases on the hyphal wall of *V. albo-atrum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 21, p. 411-423, 1982.

APÊNDICE A – Teores médios de Si (em %) nas folhas de cafeeiro dos ensaios 1 e 2.

Dose Fonte: Silicato de potássio	1º. par de folhas não inoculadas	Folhas inoculadas	Par de folhas não inoculadas próximas ao substrato
0 ppm	1.55	1.28	0.97
10 ppm	1.28	1.06	1.11
50 ppm	1.42	1.20	0.75
75 ppm	1.51	0.88	0.93
100 ppm	1.37	0.97	1.15
150 ppm	1.28	1.15	1.37

Teor (em %) de Si nas folhas de cafeeiro dos ensaios 1 e 2. Os valores ilustram a porcentagem de Si em amostra composta das folhas por tratamento/dose.

Dose Fonte: Silicato de Ca/Mg	1º. par de folhas não inoculadas	Folhas inoculadas	Par de folhas não inoculadas próximas ao substrato
0 ppm	1.55	1.5	1.55
10 ppm	1.24	0.8	0.84
50 ppm	1.24	0.97	0.62
75 ppm	0.97	0.93	0.66
100 ppm	1.15	0.84	0.53
150 ppm	1.2	0.84	0.84

Teor (em %) de Si nas folhas de cafeeiro dos ensaios 1 e 2. Os valores ilustram a porcentagem de Si em amostra composta das folhas por tratamento/dose.

APÊNDICE B - Resultados das análises estatísticas para a atividade da catalase

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a (Ta)	1	0.00109	0.00109	8.2813 *
Resíduo-a	6	0.00079	0.00013	
Parcelas	7	0.00189		
<hr/>				
Trat-b(Tb)	1	0.02607	0.02607	148.7583 **
Int. TaxTb	1	0.00186	0.00186	10.6227 *
Resíduo-b	6	0.00105	0.00018	
Subparcelas	15	0.03087		
<hr/>				
Trat-c(Tc)	4	0.01572	0.00393	18.6208 **
Int. TaxTc	4	0.00425	0.00106	5.0361 **
Int. TbxTc	4	0.00961	0.00240	11.3818 **
Int. TaxTbxTc	4	0.00279	0.00070	3.3029 *
Resíduo-c	48	0.01013	0.00021	
Total	79	0.07337		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	0.0534 bA	0.0270 aB
2 (7mM de Si)	0.0705 aA	0.0247 aB

DMS para colunas = 0.0085

Classific.c/letras minúsculas

DMS para linhas = 0.0102

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	0.0277 aB	0.0293 aB	0.0359 bB	0.0318 aB	0.0763 aA
2 (7mM de Si)	0.0310 aB	0.0374 aB	0.0645 aA	0.0451 aAB	0.0600 bA

DMS para colunas = 0.0140

Classific.c/letras minúsculas

DMS para linhas = 0.0206

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	0.0308 aC	0.0536 aB	0.0818 aA	0.0487 aBC	0.0949 aA
2 (Var. Ob.)	0.0279 aAB	0.0131 bB	0.0186 bB	0.0282 bAB	0.0414 bA

DMS para colunas = 0.0143

Classific.c/letras minúsculas

DMS para linhas = 0.0206

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	0.0328 B	0.0413 B	0.0572 B	0.0319 B	0.1039 A
12 (0mM – Ob.)	0.0225 AB	0.0173 B	0.0146 B	0.0317 AB	0.0488 A
21 (7mM – MN)	0.0287 C	0.0659 B	0.1064 A	0.0655 B	0.0859 AB
22 (7mM – Ob.)	0.0332 A	0.0090 A	0.0226 A	0.0248 A	0.0341 A

DMS para linhas = 0.0291

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 0.04389 CV%-a = 26.19 CV%-b = 30.16 CV%-c = 33.10

Desdobramento das análises para a atividade da CAT isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	0.0316 aB	0.0413 aB	0.0572 bB	0.0319 bB	0.1039aA
2 (7mM – MN)	0.0287 aC	0.0659 aBC	0.1064 aA	0.0655 aBC	0.0859 aAB

DMS para coluna = 0.0266

DMS para linha = 0.0396

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 25.60%

CV b = 30.71%

F da interação 4.1413 $p < .05$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	0.0225 aBC	0,0173 aBC	0.0146aC	0.0317 aB	0.0488aA
2 (7mM – Ob.)	0.0332 aA	0.0090 aB	0.0226 aAB	0.0248 aAB	0.0341 bA

DMS para coluna = 0.0114

DMS para linha = 0.0169

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 27.28

CV b = 31.44%

F da interação 3.6715 $p < .05$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE C - Resultados das análises estatísticas para a atividade da guaiacol peroxidase.

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a(Ta)	1	23.73922	23.73922	302.3347 **
Resíduo-a	6	0.47112	0.07852	
Parcelas	7	24.21034		
<hr/>				
Trat-b(Tb)	1	46.60908	46.60908	549.0804 **
Int. TaxTb	1	5.39527	5.39527	63.5592 **
Resíduo-b	6	0.50931	0.08489	
Subparcelas	15	76.72401		
<hr/>				
Trat-c(Tc)	4	4.36059	1.09015	6.2865 **
Int. TaxTc	4	7.06716	1.76679	10.1885 **
Int. TbxTc	4	2.69410	0.67353	3.8840 **
Int. TaxTbxTc	4	3.68254	0.92064	5.3090 **
Resíduo-c	48	8.32366	0.17341	
Total	79	102.85205		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	2.8232 aA	0.7772 aB
2 (7mM de Si)	1.2143 bA	0.2071 bB

Tabela 8.

DMS para colunas = 0.1969

DMS para linhas = 0.2254

Classific.c/letras minúsculas

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	1.7958 aB	2.4736 aA	1.8110 aB	2.0349 aAB	0.8855 aC
2 (7mM de Si)	0.9323 bA	0.5659 bA	0.6771 bA	0.6151 bA	0.7631 aA

DMS para colunas = 0.3941

DMS para linhas = 0.5904

Classific.c/letras minúsculas

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	2.0828 aA	2.5485 aA	2.0335 aA	2.1446 aA	1.2842 aB
2 (Var. Ob.)	0.6454 bA	0.4910 bA	0.4546 bA	0.5054 bA	0.3644 bA

DMS para colunas = 0.3957

DMS para linhas = 0.5904

Classific.c/letras minúsculas

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	2.6365 B	4.1327 A	2.8364 B	3.1699 B	1.3402 C
12 (0mM – Ob.)	0.9552 A	0.8145 A	0.7856 A	0.9000 A	0.4308 A
21 (7mM – MN)	1.5291 A	0.9644 A	1.2306 A	1.1194 A	1.2281 A
22 (7mM – Ob.)	0.3356 A	0.1675 A	0.1236 A	0.1108 A	0.2980 A

DMS para linhas = 0.8349

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 1.25543 CV%-a = 22.32 CV%-b = 23.21 CV%-c = 33.17

Desdobramento das análises para a atividade da GPX isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	2.5140 aAB	3.7126 aA	3.1740 aA	3.7585 aA	1.3304 aB
2 (7mM – MN)	1.4247 bA	1.1842 bA	1.4957 bA	1.0797 bA	1.5298 bA

DMS para coluna = 0.9689

DMS para linha = 1.4520

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 27.82%

CV b = 37.73%

F da interação 5.1056 $p < .01$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	0.9552 aA	0.8145 aA	0.7856 aA	0.9 aA	0.4308 aB
2 (7mM – Ob.)	0.3356 bA	0.1675 aAB	0.1236 bAB	0.1107 bB	0.2980 aAB

DMS para coluna = 0.1488

DMS para linha = 0.2219

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 17.61%

CV b = 21.63%

F da interação 11.29 $p < .01$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE D - Resultados das análises estatísticas para a atividade da ascorbato peroxidase.

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a(Ta)	1	592.66420	592.66420	124.1986 **
Resíduo-a	4	19.08763	4.77191	
Parcelas	5	611.75183		
<hr/>				
Trat-b(Tb)	1	303.57093	303.57093	63.5226 **
Int. TaxTb	1	118.51794	118.51794	24.8000 **
Resíduo-b	4	19.11577	4.77894	
Subparcelas	11	1052.95646		
<hr/>				
Trat-c(Tc)	4	199.51050	49.87762	8.6020 **
Int. TaxTc	4	266.89625	66.72406	11.5074 **
Int. TbxTc	4	40.35948	10.08987	1.7401 ns
Int.TaxTbxTc	4	23.74172	5.93543	1.0236 ns
Resíduo-c	32	185.54800	5.79838	
Total	59	1769.01241		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	4.9070 bB	12.2165 bA
2 (7mM de Si)	14.0036 aA	15.6914 aA

Tabela 8.

DMS para colunas = 1.8394

DMS para linhas = 2.2183

Classific.c/letras minúsculas

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	7.7699 bA	8.4200 bA	10.2569 aA	7.8162 bA	8.5458 bA
2 (7mM de Si)	16.4188 aB	12.6170 aBC	11.0928 aC	12.4516 aBC	21.6575 aA

DMS para colunas = 2.7737

DMS para linhas = 4.0232

Classific.c/letras minúsculas

Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	9.4564	8.9586	8.4316	8.8908	11.5392
2 (Var. Ob.)	14.7323	12.0784	12.9182	11.3769	18.6641

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo.

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	4.0976	5.4259	6.5061	4.0986	4.4065
12 (0mM – Ob.)	11.4422	11.4141	14.0078	11.5337	12.6850
21 (7mM – MN)	14.8151	12.4913	10.3570	13.6830	18.6718
22 (7mM – Ob.)	18.0224	12.7427	11.8286	11.2202	24.6431

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo.

MG = 11.70464 CV%-a = 18.66 CV%-b = 18.68 CV%-c = 20.57

Desdobramento das análises para a atividade da APX isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	4.0976 bA	5.4259 bA	6.5061 aA	4.0986 bA	4.4065 bA
2 (7mM – MN)	14.8158 aAB	11.8250 aB	10.3570 aB	13.6830 aAB	18.6718 aA

DMS para coluna = 4.6284

DMS para linha = 6.8436

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 28.35%

CV b = 29.09%

F da interação 3.2318 $p < .05$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	11.4422 bA	11.4141 aA	14.0078 aA	11.5337 aA	12.6850 bA
2 (7mM – Ob.)	18.0224 aB	12.7427 aC	11.8286 aA	11.2202 aC	24.6431 aA

DMS para coluna = 3.4106

DMS para linha = 5.1047

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 13.30%

CV b = 14.59%

F da interação 11.97 $p < .01$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE E - Resultados das análises estatísticas para a atividade da quitinase

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a(Ta)	1	0.00018	0.00018	0.6548 ns
Resíduo-a	4	0.00110	0.00027	
Parcelas	5	0.00128		
<hr/>				
Trat-b(Tb)	1	0.02493	0.02493	224.8682 **
Int. TaxTb	1	0.00007	0.00007	0.5872 ns
Resíduo-b	4	0.00044	0.00011	
Subparcelas	11	0.02672		
<hr/>				
Trat-c(Tc)	4	0.00546	0.00136	4.7961 **
Int. TaxTc	4	0.00367	0.00092	3.2203 *
Int. TbxTc	4	0.00579	0.00145	5.0834 **
Int. TaxTbxTc	4	0.00293	0.00073	2.5702 ns
Resíduo-c	32	0.00911	0.00028	
Total	59	0.05366		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	0.0905	0.0476
2 (7mM de Si)	0.0919	0.0532

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	0.0576 aA	0.0754 aA	0.0765 aA	0.0604 aA	0.0755 bA
2 (7mM de Si)	0.0690 aB	0.0624 aB	0.0622 aB	0.0663 aB	0.1028 aA
DMS para colunas = 0.0197			DMS para linhas = 0.0282		
Classific.c/letras minúsculas			Classific.c/letras maiúsculas		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	0.0702 aB	0.0935 aB	0.0964 aAB	0.0742 aB	0.1217 aA
2 (Var. Ob.)	0.0564 aA	0.0443 bA	0.0422 bA	0.0525 bA	0.0567 bA
DMS para colunas = 0.0185			DMS para linhas = 0.0282		
Classific.c/letras minúsculas			Classific.c/letras maiúsculas		

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	0.0723	0.1050	0.1100	0.0674	0.0977
12 (0mM – Ob.)	0.0429	0.0457	0.0429	0.0533	0.0533
21 (7mM – MN)	0.0681	0.0819	0.0829	0.0810	0.1456
22 (7mM – Ob.)	0.0700	0.0429	0.0415	0.0516	0.0600

MG = 0.07080 CV%-a = 23.41 CV%-b = 14.87 CV%-c = 23.83

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Desdobramento das análises para a atividade da quitinase isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	0.0723 aA	0.1050 aA	0.1100 aA	0.0674 aA	0.0977 bA
2 (7mM – MN)	0.0681 aB	0.0819 aB	0.0829 aB	0.0810 aB	0.1456 aA

DMS para coluna = 0.0314

DMS para linha = 0.0465

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 19.71%

CV b = 20.36%

F da interação 4.0832 $p < .05$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	0.0429	0.0457	0.0429	0.0533	0.0533
2 (7mM – Ob.)	0.0700	0.0429	0.0415	0.0516	0.0600

CV a = 15.69%

CV b = 29.70%

F da interação 1.0677 não significativo

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

APÊNDICE F - Resultados das análises estatísticas para a atividade da glucanase

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a(Ta)	1	0.00060	0.00060	1.8292 ns
Resíduo-a	4	0.00132	0.00033	
Parcelas	5	0.00192		
<hr/>				
Trat-b(Tb)	1	0.03057	0.03057	124.3965 **
Int. TaxTb	1	0.00010	0.00010	0.4211 ns
Resíduo-b	4	0.00098	0.00025	
Subparcelas	11	0.03358		
<hr/>				
Trat-c(Tc)	4	0.00966	0.00241	8.9570 **
Int. TaxTc	4	0.00561	0.00140	5.2016 **
Int. TbxTc	4	0.00565	0.00141	5.2370 **
Int.TaxTbxTc	4	0.00382	0.00096	3.5439 *
Resíduo-c	32	0.00862	0.00027	
Total	59	0.06693		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	0.0737	0.0259
2 (7mM de Si)	0.0774	0.0349

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	0.0367 aA	0.0523 aA	0.0595 aA	0.0445 aA	0.0563 bA
2 (7mM de Si)	0.0412 aB	0.0432 aB	0.0453 aB	0.0539 aB	0.0973 aA
DMS para colunas = 0.0198			DMS para linhas = 0.0274		
Classific.c/letras minúsculas			Classific.c/letras maiúsculas		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	0.0504 aC	0.0739 aBC	0.0790 aB	0.0611 aBC	0.1136 aA
2 (Var. Ob.)	0.0275 bA	0.0216 bA	0.0258 bA	0.0373 bA	0.0400 bA
DMS para colunas = 0.0191			DMS para linhas = 0.0742		
Classific.c/letras minúsculas			Classific.c/letras maiúsculas		

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	0.0564 AB	0.0856 AB	0.0938 A	0.0503 B	0.0826 AB
12 (0mM – Ob.)	0.0170 A	0.0189 A	0.0251 A	0.0387 A	0.0300 A
21 (7mM – MN)	0.0444 B	0.0622 B	0.0642 B	0.0719 B	0.1446 A
22 (7mM – Ob.)	0.0380 A	0.0243 A	0.0264 A	0.0359 A	0.0499 A
DMS para linhas = 0.0388		Classific.c/letras maiúsculas			

MG = 0.05300 CV%-a = 34.25 CV%-b = 29.58 CV%-c = 30.97

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Desdobramento das análises para a atividade da glucanase isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	0.0564 aA	0.0856 aA	0.0938 aA	0.0503 aA	0.0826 bA
2 (7mM – MN)	0.0444 aB	0.0622 aB	0.0642 aB	0.0719 aB	0.1446 aA

DMS para coluna = 0.0346

DMS para linha = 0.0502

Classific. c/letra minúscula

Classific. c/letra maiúscula

CV a = 28.31%

CV b = 26.50%

F da interação 5.4317 $p < .01$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	0.0170	0.0189	0.0251	0.0387	0.0300
2 (7mM – Ob.)	0.0380	0.0243	0.0264	0.0359	0.0499

CV a = 30.61%

CV b = 28.57%

F da interação 1.2902 não significativo

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

APÊNDICE G - Resultados das análises estatísticas para a atividade da PAL

Quadro de análise

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Trat-a(Ta)	1	0.06849	0.06849	1.2952 ns
Resíduo-a	4	0.21151	0.05288	
Parcelas	5	0.27999		
Trat-b(Tb)	1	1.77370	1.77370	40.4495 **
Int. TaxTb	1	0.02910	0.02910	0.6636 ns
Resíduo-b	4	0.17540	0.04385	
Subparcelas	11	2.25819		
Trat-c(Tc)	4	0.64548	0.16137	2.3675 ns
Int. TaxTc	4	0.18778	0.04694	0.6887 ns
Int. TbxTc	4	0.47673	0.11918	1.7485 ns
Int. TaxTbxTc	4	1.41617	0.35404	5.1942 **
Resíduo-c	32	2.18117	0.06816	
Total	59	7.16552		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Abreviações

F.V. = Fonte de variação

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado

Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

Trat-a = Tratamento-a (Tratamentos das parcelas – Doses de Si aplicadas 0mM e 7mM)

Trat-b = Tratamento-b (Tratamentos das subparcelas – Cultivares Mundo Novo e Obatã)

Trat-c = Tratamentos-c (Tratamentos das subsubparcelas – Tempos analisados)

Interação 1. Tratamento-a X tratamento b

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Cultivares)	
	1 (Var. Mundo Novo - MN)	2 (Var. Obatã – Ob.)
1 (0mM de Si)	0.9634	0.6635
2 (7mM de Si)	1.0750	0.6871

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

Interação 2. Tratamento-a X Tratamento-c

Tratamento a	Tratamento c (tempo de coleta após a inoculação)				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (0mM de Si)	0.8566	0.6219	0.8397	0.9553	0.7938
2 (7mM de Si)	1.0389	0.8152	0.8818	0.9856	0.6837

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

Interação 3. Tratamento-b X tratamento-c

Tratamento b	Tratamento c				
	1 (0h)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)
1 (Var. MN)	1.0159	0.9575	1.1682	1.1177	0.8365
2 (Var. Ob.)	0.8795	0.4796	0.5533	0.8231	0.6410

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo

Interação 4. Tratamento-ab X Tratamento-c

Tratamento ab	Tratamento c				
	1	2	3	4	5
11(0mM – MN)	1.1461 A	0.7653 A	1.0571 A	0.8820 A	0.9663 A
12 (0mM – Ob.)	0.5670 A	0.4785 A	0.6222 A	1.0285 A	0.6214 A
21 (7mM – MN)	0.8857 AB	1.1497 AB	1.2793 AB	1.3534 A	0.7067 B
22 (7mM – Ob.)	1.1920 A	0.4807 B	0.4843 B	0.6178 AB	0.6606 AB

DMS para linhas = 0.6169 Classific.c/letras maiúsculas

MG = 0.84723 CV%-a = 27.14 CV%-b = 24.72 CV%-c = 30.82

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Desdobramento das análises para a atividade da PAL isolando as cultivares

Mundo Novo

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – MN)	1.1461	0.7653	1.0571	0.8819	0.9656
2 (7mM – MN)	0.8857	1.1497	1.2793	1.3534	0.7067

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo

MG = 1.01908 CV%-a = 29.24230 CV%-b = 24.31407

Obatã

Tratamento a (Doses)	Tratamento b (Tempo de coleta após a inoculação)				
	1	2	3	4	5
1 (0mM – Ob.)	0.5670	0.4785	0.6222	1.0285	0.6214
2 (7mM – Ob.)	1.1920	0.4807	0.4843	0.6178	0.6606

CV a = 30.61%

CV b = 28.57%

F da interação 2.8882 não significativo

Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi

MG = 0.67530 CV%-a = 13.30784 CV%-b = 40.53469

CONCLUSÕES FINAIS

Muitas são as hipóteses sobre o papel do Si em plantas não acumuladoras. Um deles inclui sua participação no balanço nutricional, estrutura da planta e resistência a estresses. Isso pode ser traduzido em melhor crescimento e/ou rendimento das culturas.

Neste trabalho foi possível observar os seguintes efeitos da adição de Si à solução nutritiva em plantas de cafeeiro:

- O Si não altera o desenvolvimento das plantas de cafeeiro nos parâmetros altura, número de folhas, área foliar;
- Redução dos sintomas da ferrugem em plantas de cafeeiro suscetíveis;
- Ativação das enzimas do estresse oxidativo (CAT, SOD, APX) em plantas suscetíveis;
- Ativação das enzimas relacionadas à defesa (quitinase, glucanase, PAL) em plantas suscetíveis.

Aumentando a capacidade de absorção do Si, seus efeitos benéficos também poderiam ser aumentados. O conhecimento do sistema ativo de transporte de Si em plantas de arroz pode fornecer subsídios para pesquisas futuras em plantas não acumuladoras.

Os dados revelados neste trabalho demonstram várias respostas bioquímicas de defesa do cafeeiro estimuladas pelo Si e também as diferenças nas respostas em plantas suscetíveis e resistentes à ferrugem. Estes mecanismos devem ser estudados com maiores detalhes a fim de que haja uma melhor compreensão das estratégias de defesa empregadas pela planta.

Curiosidade: Além de seus sabidos benefícios na resistência em plantas o Si também vêm sendo utilizado com estimulante dos mecanismos de defesa quando administrado juntamente com vacinas em organismos vivos. Estudos do laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantã mostraram que nos estudos com camundongos a sílica usada como meio de transporte das vacinas melhora a resposta de indivíduos que produzem pouco anticorpo, além de não ser tóxica (Revista FAPESP, edição 127, setembro – 2006).