

Notas Científicas

Silício no processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja

Maria Fernanda Antunes da Cruz⁽¹⁾, Larisse de Freitas Silva⁽¹⁾, Fabrício Ávila Rodrigues⁽²⁾, João Marcos de Araujo⁽¹⁾ e Everaldo Gonçalves de Barros⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Biologia Geral, Avenida P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: fertunes@bol.com.br, larisse_bio@yahoo.com.br, jmaraujo@ufv.br, ebarros@ufv.br ⁽²⁾UFV, Departamento de Fitopatologia. E-mail: fabricio@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do silício (Si) no processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja cultivada em solução nutritiva com ou sem Si. Observações realizadas sob microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura indicaram que, nos folíolos das plantas supridas com Si, as urédias foram menores e em menor número. Houve redução de 27, 23 e 60% no número de lesões, urédias fechadas e urédias abertas, respectivamente, nos folíolos das plantas com Si. Plantas de soja supridas com Si apresentam redução nos sintomas da ferrugem-asiática-da-soja.

Termos para indexação: *Glycine max*, ferrugem-asiática-da-soja, nutrição mineral, resistência.

Silicon on the infection process of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean leaflets

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of silicon (Si) on the infection process of *Phakopsora pachyrhizi* in leaflets of soybean plants grown in nutrient solution with or without Si. Observations done with light microscope and scanning electron microscope indicated that, in leaflets of plants supplied with Si, uredia were smaller and fewer in number. There were reductions of 27, 23 and 60% in the number of lesions, closed uredia and open uredia, respectively, in leaflets of plants with Si. Soybean plants supplied with Si show reduction in Asian soybean rust symptoms.

Index terms: *Glycine max*, Asian soybean rust, mineral nutrition, resistance.

A ferrugem-asiática-da-soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é uma das doenças mais destrutivas da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], em virtude da desfolha prematura, que ocasiona perdas significativas na produção (Hartman et al., 2005). Os sintomas iniciais dessa doença são áreas cloróticas nas folhas, principalmente em plantas no estágio de floração, nas quais surgem, posteriormente, urédias de cor pardo-clara a pardo-avermelhada, subepidérmicas e erupentes, contendo inúmeros urediniosporos (Reis et al., 2006).

A principal medida de controle da FAS é o uso de fungicidas, uma vez que cultivares comerciais com resistência completa à doença ainda não estão disponíveis (Hartman et al., 2005; Li et al., 2010). Porém, o uso de fungicidas aumenta o custo de produção (Yorinori et al., 2005), além de ter potencial para causar danos ao meio ambiente. Neste contexto, a nutrição mineral com base no fornecimento de silício

torna-se uma alternativa para reduzir a intensidade de doenças em inúmeras espécies de plantas (Datnoff et al., 2007). No entanto, estudos sobre a eficiência do uso do Si para reduzir a severidade da FAS são escassos e não conclusivos (Rodrigues et al., 2009; Lemes et al., 2011), sobretudo quanto aos aspectos citológicos da interação soja-*P. pachyrhizi*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Si no processo infeccioso de *P. pachyrhizi* em folíolos de soja cultivada em solução nutritiva com ou sem Si.

Plântulas de soja (cultivar MG/BR 46 Conquista) foram cultivadas em vasos de plástico contendo 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), com algumas modificações: 2,5 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.4H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃; 1,0 mmol L⁻¹ de KNO₃; 1,0 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄; 1,0 mmol L⁻¹ de KCl; 1,0 mmol L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,2 µmol L⁻¹ de H₃BO₃; 0,2 µmol L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 0,2 µmol L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; 0,2 µmol L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O; 0,2 µmol L⁻¹ de Na₂MoO₄.4H₂O; 0,5 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA.2H₂O;

e 0,5 mmol L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 ou 2,0 mmol L⁻¹ de Si (-Si ou +Si, respectivamente). O pH da solução nutritiva, trocada a cada três dias, foi ajustado diariamente para 5,8, com 1,0 mol L⁻¹ de HCl ou de NaOH. As plantas cresceram em casa de vegetação, com temperatura de 28±2°C, em sistema de hidroponia com aeração constante.

Ao atingirem o estágio V6 (Fehr & Caviness, 1977), as plantas foram pulverizadas com suspensão de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, na concentração de 1x10⁴ mL⁻¹, até o escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (24 horas no escuro, com umidade relativa de 95±5%) e, em seguida, foram transferidas para casa de vegetação, com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 24±2°C e umidade relativa de 95±5%. Aos dez dias após a inoculação (DAI), avaliou-se o número de lesões, o número de urédias fechadas (não desenvolvidas) e de urédias abertas (completamente desenvolvidas, com liberação de urediniósporos) em dois folíolos por planta. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com oito repetições e três plantas por repetição. Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância, e a significância dos tratamentos foi determinada pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Para a microscopia de luz, aos dez DAI, foram coletados 12 folíolos de soja. De cada folíolo, foram obtidos dois fragmentos de 10 mm² com sintomas de FAS. As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) por 48 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato Historesin (Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Foram confeccionados 12 blocos por tratamento, e cada bloco foi composto por dois fragmentos de folíolo. Cortes transversais de 5 µm de espessura, obtidos com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático, modelo RM 2255 (Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, EUA), foram corados com azul de toluidina a 0,05% (pH 4,7). Foram obtidos 12 cortes semifinos por bloco, os quais foram distribuídos em seis lâminas de vidro. Os cortes semifinos foram observados em microscópio de luz modelo AX70RF (Olympus Optical, Tóquio, Japão)

com sistema fotográfico U-Photo e câmera digital Spot Insightcolour 3.2.0 (Diagnostic Instruments Inc., Merrick, NY, EUA).

Para as observações no microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram coletados oito folíolos por planta, tendo-se obtido dois fragmentos de 5 mm² de cada folíolo que apresentava sintomas da FAS. Os fragmentos foram transferidos para frascos de vidro contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) e armazenados em geladeira. Após uma semana, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato de sódio por quatro vezes, durante 10 min, e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) por 2 horas à temperatura ambiente (Curvelo et al., 2010). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas, tendo-se realizado três passagens na última concentração, no mesmo intervalo de tempo. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico, com uso do aparelho “critical point dryer”, modelo CPD 020 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), e montados sobre suportes metálicos de alumínio cobertos com fita adesiva dupla-face (Curvelo et al., 2010). Para visualizar as estruturas de *P. pachyrhizi* no interior do tecido foliar, a epiderme de alguns fragmentos foi removida com fita adesiva. Em seguida, todos os fragmentos foram cobertos com ouro coloidal por metalização no aparelho “sputter coater” acoplado a um “freezing drying unit” modelo FDU010 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos foram examinados no MEV, modelo Leo 1430 VP (Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra), operado a 10 kV, para obtenção das eletromicrografias.

Observou-se grande quantidade de hifas de *P. pachyrhizi* na região das urédias, no parênquima lacunoso das amostras dos folíolos de plantas com ou sem Si (Figura 1 A–D). As hifas penetraram nas células supostamente sadias, as quais, gradativamente, adquiriram aspecto plasmolisado (Figura 1 A e B), o que culminou em necrose. Nos folíolos das plantas não supridas com Si, surgiram espaços entre os urediniósporos e houve aumento no tamanho das urédias (Figura 1 A e B). Os urediniósporos tornaram-se equinulados e fortemente corados pelo azul de toluidina. A epiderme abaxial rompeu-se, com liberação concomitante dos urediniósporos (Figura 1 A e B). Nos folíolos das plantas não supridas com Si,

a maioria das urédias encontrava-se completamente desenvolvida (aberta e com urediniósporos) (Figura 1 A, B e E), ao contrário do que foi observado para as urédias nos folíolos das plantas supridas com Si, que se encontravam, na sua maioria, fechadas (Figura 1 C, D e F).

Nos folíolos das plantas supridas com Si, houve redução de 27, 23 e 60%, respectivamente, no número de lesões, de urédias não desenvolvidas (fechadas) e de urédias completamente desenvolvidas (abertas, com liberação de urediniósporos) por folíolo, em comparação aos folíolos das plantas sem Si (Tabela 1).

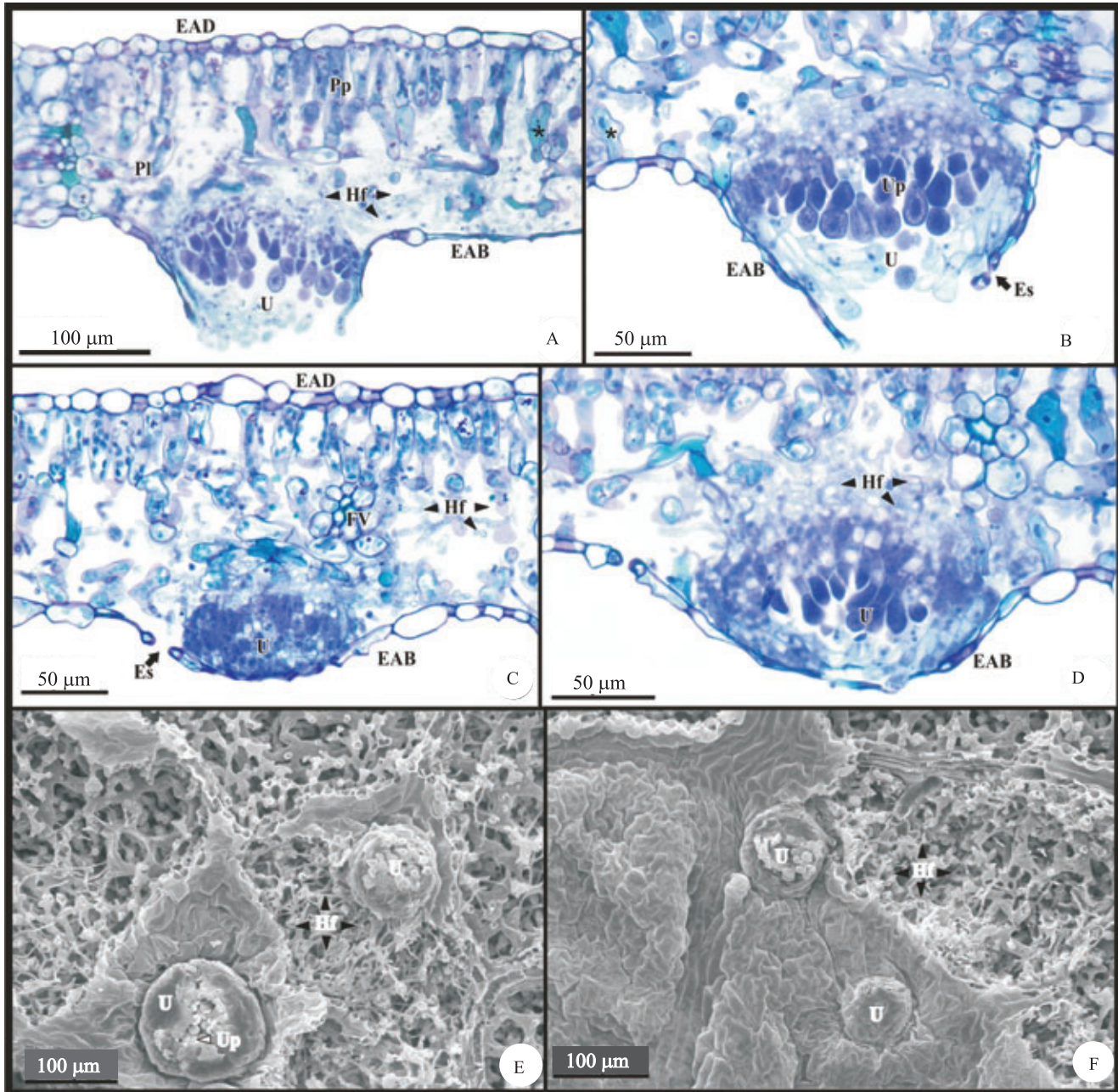


Figura 1. Micrografias de luz (A–D) e eletromicrografias de varredura (E e F) do processo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de plantas de soja sem (A, B e E) ou com (C, D e F) silício. EAD, epiderme adaxial; EAB, epiderme abaxial; FV, feixe vascular; Pp, parênquima paliçádico; Pl, parênquima lacunoso; Es, estômato; U, urédia; Hf, hifas; Up, urediniósporos. *Célula de aspecto plasmolisado.

Tabela 1. Número de lesões, de urédias fechadas (não desenvolvidas) e de urédias abertas (completamente desenvolvidas, com liberação de urediniosporos) em folíolos de plantas de soja sem (-Si) ou com (+Si) suprimento de silício, aos dez dias após inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*.

Tratamentos	Lesões	Urédias fechadas	Urédias abertas
-Si	12,37	21,25	16,00
+Si	9,00	16,33	6,41
Teste F	9,51*	6,75*	89,98*
CV (%)	30,95	32,34	26,39

*Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Lemes et al. (2011) verificaram reduções de 43 e 36% na área abaixo da curva do progresso da FAS, quando plantas de soja foram cultivadas em solo contendo silicato de cálcio ou foram pulverizadas com silicato de potássio, respectivamente, tendo observado aumento em até três dias para o aparecimento dos sintomas da doença. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues et al. (2009), que relataram redução de 70% na severidade da FAS com a aplicação foliar de silicato de potássio. Lima et al. (2010), ao cultivar plantas de soja em solução nutritiva contendo doses crescentes de Si e inoculadas com *P. pachyrhizi*, observaram redução na área abaixo da curva do número de lesões da FAS e aumento nas concentrações de lignina. É provável que a deposição de Si no apoplasto dos tecidos foliares evite a penetração de fungos patogênicos por meio da formação de barreira física (Datnoff et al., 2007). Além disso, o Si pode potencializar os mecanismos de defesa da planta à infecção por patógenos (Fauteux et al., 2005).

O silício reduz os sintomas da ferrugem-asiática-da-soja e pode ser uma alternativa para o manejo integrado desta doença.

Referências

CURVELO, C.R.S.; RODRIGUES, F.A.; BERGER, P.G.; REZENDE, D.C. Microscopia eletrônica de varredura do processo

infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.108-113, 2010.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and plant nutrition. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (Ed.). **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2007. p.233-246.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREAL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.1-6, 2005.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11p. (Special report, 80).

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v.89, p.664-666, 2005.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station. Circular, 347).

LEMES, E.M.; MACKOWIAK, C.L.; BLOUNT, A.; MAROIS, J.J.; WRIGHT, D.L.; COELHO, L.; DATNOFF, L.E. Effects of silicon applications on soybean rust development under greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, v.95, p.317-324, 2011.

LI, X.; ESKER, P.D.; PAN, Z.; DIAS, A.P.; XUE, L.; YANG, X.B. The uniqueness of the soybean rust pathosystem: an improved understanding of the risk in different regions of the world. **Plant Disease**, v.94, p.796-806, 2010.

LIMA, L.M. de; POZZA, E.D.; AZIZ, A.A.A.; FONSECA, T.A. de P.S.; CARVALHO, J.G. de. Quantificação da ferrugem asiática e aspectos nutricionais de soja suprida com silício em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.51-56, 2010.

REIS, E.M.; BRESOLIN, A.C.R.; CARMONA, M. **Doenças da soja I: ferrugem asiática**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. 48p.

RODRIGUES, F.A.; DUARTE, H.S.S.; DOMICIANO, G.P.; SOUZA, C.A.; KORNDORFER, G.H.; ZAMBOLIM, L. Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. **Australasian Plant Pathology**, v.38, p.366-372, 2009.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v.89, p.675-677, 2005.

Recebido em 4 de setembro de 2011 e aprovado em 30 de dezembro de 2011