

IVANETE TONOLE DA SILVA

**POSSÍVEIS EFEITOS DO SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO DA ESTRIA
BACTERIANA DO TRIGO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

T

S586p
2008
Silva, Ivanete Tonole da, 1977-
Possíveis efeitos do silício no desenvolvimento da estria
bacteriana do trigo / Ivanete Tonole da Silva.
– Viçosa, MG, 2008.
ix, 40f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 35-40.

1. Trigo - Efeito do silício. 2. Trigo - Doenças e pragas -
Aspectos bioquímicos. 3. Epidemiologia. 4. Doenças e pragas
- Controle. 5. Bactérias - Resistência à doenças e pragas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.1123

IVANETE TONOLE DA SILVA

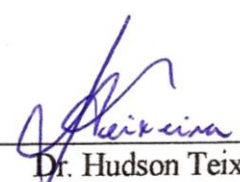
POSSÍVEIS EFEITOS DO SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO DA ESTRIA
BACTERIANA DO TRIGO

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

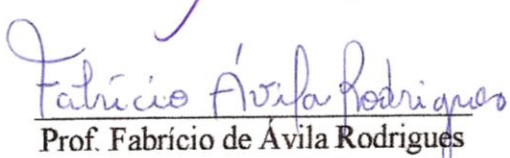
APROVADA: 18 de agosto de 2008.




Prof. Andrea Bittencourt Moura



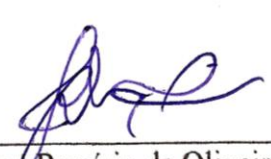
Dr. Hudson Teixeira



Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues
(Co-orientador)



Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Co-Orientador)



Prof. Jose Rogério de Oliveira
(Orientador)

A Deus.

*Aos meus amados pais, Geraldo e Carmem,
pelo mais puro exemplo de simplicidade,*

dignidade e sabedoria.

Aos meus irmãos Ivan e Ivani, exemplos de garra e superação.

Aos meus grandes amigos, Marcos Vale, Sueli e Fátima.

Ofereço esta conquista!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa em toda sua excelência e, ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e concretização deste projeto.

Ao professor e amigo José Rogério de Oliveira, pela magnífica convivência e credibilidade depositada ao longo destes anos, pela orientação pessoal e profissional.

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues, pela orientação e incentivo, pelos esclarecimentos científicos e pela paciência.

Aos professores Reginaldo da Silva Romeiro, Andrea Bittencourt Moura e ao Dr. Hudson Teixeira, pela contribuição acadêmica e pelas sugestões que aperfeiçoaram o manuscrito.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA ESALQ/USP) na pessoa da Cláudia de Alencar Vanetti, pela disponibilização de infraestrutura e ajuda nos trabalhos.

Ao Professor Gaspar H. Konrdörfer da Universidade Federal de Uberlândia, pela realização das análises de silício no solo e planta.

A professora Maria Goretti de Almeida Oliveira e ao professor Reginaldo da Silva Romeiro por disponibilizarem os preciosos equipamentos de seus laboratórios.

Aos colegas de pós-graduação, professores e funcionários do departamento de fitopatologia, pela contribuição acadêmica, pelo incentivo e pelo agradabilíssimo convívio.

As amigas Maria Sueli Cardoso de Oliveira, Maria Raquel Silva, Helena Barone Freire, Cíntia Armmond e Vivian Carré Missio que independente da distância sempre estiveram presentes, pelo estímulo e pela cumplicidade.

Aos parceiros de trabalho Daniel Schurtz, Mariana Maciel, Camila Lage, Patrícia Ricardino e Sandra Cerqueira Pereira pela troca de experiências e pelo carinho.

Ao amigo e companheiro Marcos Vale, carinho, respeito e inesgotável paciência.

A Deus, pela oportunidade de recomeçar a cada novo dia... por Seu incondicional amor.

BIOGRAFIA

Ivanete Tonole da Silva, filha de Geraldo Alceno da Silva e Maria do Carmo Tonole da Silva, nasceu na cidade de Castelo, estado do Espírito Santo, em 1^o de Dezembro de 1977. Em março de 2001 graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Nesta mesma instituição concluiu os cursos de Mestrado e Doutorado em Fitopatologia.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1.O patossistema <i>Triticum aestivum</i> vs. <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	1
1.2.Silício no sistema solo-planta e no controle de doenças	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1.Material de solo	7
2.2.Fonte e doses de silício	8
2.3.Cultivar de trigo e adubação das plantas	8
2.4.Caracterização do isolado de <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> e inoculação das plantas de trigo	9
2.5.Quantificação dos componentes de resistência	10
2.5.1.Período de incubação (PI) e período latente (PL)	10
2.5.2.Dinâmica populacional <i>in planta</i> de <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	10
2.5.3.Extravasamento de eletrólitos (EE) do tecido hospedeiro	11
2.5.4.Severidade real da estria bacteriana do trigo	12
2.6.Determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa da planta a patógenos	12
2.6.1.Quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)	12
2.6.2.Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)	13
2.6.3.Polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1)	14
2.7.Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos	15
2.7.1.Compostos fenólicos solúveis totais (CFST)	15
2.7.2.Teor dos derivados da lignina ácido tioglicólico (LATG)	16
2.8.Análise do teor foliar de silício e cálcio	17
2.9.Análises Estatísticas	17
2.10.Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	17
3. RESULTADOS	19
3.1.Teor foliar de silício e cálcio	19
3.2.Quantificação de alguns componentes de resistência	19
3.2.1.Período de incubação (PI) e período latente (PL)	19
3.2.2.Dinâmica populacional <i>in planta</i> da <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	20
3.2.3.Extravasamento de eletrólitos pelo tecido hospedeiro (EE)	21
3.2.4.Severidade real da estria bacteriana do trigo	21
3.3.Atividade de enzimas relacionadas com a defesa da planta	23
3.3.1.Quitinases	23
3.3.2.Peroxidases	23
3.3.3.Polifenoloxidasas	24

3.4.Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos	25
3.4.1.Compostos fenólicos solúveis totais (CFST)	25
3.4.2.Teor dos derivados da lignina ácido tioglicólico (DLATG)	26
3.5.Análise de correlação de Pearson	26
3.6.Microscopia Eletrônica de Varredura	27
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

SILVA, Ivanete Tonole da. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2008.

Possíveis efeitos do silício no desenvolvimento da estria bacteriana do trigo.

Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-Orientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Reginaldo da Silva Romeiro.

O presente trabalho avaliou o efeito do silício (Si) no desenvolvimento da estria bacteriana do trigo, causada pela bactéria *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), e investigou por meio de microscopia e de marcadores bioquímicos mecanismos de defesa possivelmente potencializados pelo elemento Si. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Plantas de trigo da cultivar BR18 foram cultivadas em vasos plásticos contendo 1 kg de solo, ao qual adicionou-se 0,387 g de carbonato de cálcio p.a. (tratamento sem Si) ou 0,30 g Si kg⁻¹ de solo (tratamento com Si) sob a forma de silicato de cálcio ou volastonita. Os ensaios foram conduzidos em duas etapas. Na primeira, plantas de trigo entre o 37^o e o 41^o dia após a semeadura (d.a.s) foram inoculadas com suspensão bacteriana (OD₅₄₀ = 0,05 ou OD₅₄₀ = 0,1) para avaliar os componentes de resistência período de incubação (PI), período latente (PL), dinâmica populacional da bactéria *in planta* (DP), extravasamento de eletrólitos (EE) e severidade real da doença. Estes ensaios foram conduzidos duas vezes. Na segunda etapa, plantas de trigo entre o 37^o e o 41^o d.a.s foram inoculadas com suspensão bacteriana (OD₅₄₀ = 0,1) para quantificar a atividade enzimática das quitinases (QUI), peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PFO). Determinou-se também a concentração dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina ácido tioglicólico (DLATG). Amostras para a análise microscópica e dos teores foliares de Si e de cálcio foram coletadas em ambas etapas do trabalho. Para os teores foliares de Si e cálcio verificou-se diferença significativa apenas para o fator Si. Plantas supridas ou não com o elemento Si não diferiram estatisticamente quanto aos componentes de resistência PI, PL, DP, EE e severidade. Diferenças significativas e pontuais entre plantas supridas e não supridas com Si foram obtidas na determinação da atividade enzimática das POX, PFO e DLATG. No que diz respeito à determinação das QUI, diferenças estatísticas foram obtidas ao longo de todo o período de avaliação. Neste caso, plantas de trigo não supridas com Si e infectadas pela Xtu foram as que apresentaram maior atividade. Observações ao microscópio eletrônico de varredura revelaram degradação de cutícula e

colapso do tecido parênquimático em folhas de trigo infectadas. Estas observações nos permitem concluir que tais danos estruturais ocorreram em função da presença do patógeno Xtu. Mecanismos de resistência potencializados pelo Si não foram observados.

ABSTRACT

SILVA, Ivanete Tonole da. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2008.

Possible effects of silicon on wheat black chaff development. Advisor: José Rogério de Oliveira. Co-Advisors: Fabrício de Ávila Rodrigues and Reginaldo da Silva Romeiro.

The present study evaluated the effects of silicon (Si) on wheat black chaff development, caused by *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), and the defense mechanisms enhanced by this element by microscopy and biologic markers. The experiments were conducted in greenhouse in a completely randomized design with four replications. Wheat plants (cultivar BR18) were grown on plastic pots containing 1 kg of soil with the addition of 0.387 g of calcium carbonate (treatment without Si) or 0.3 g Si (treatment with Si) using wollastonite as the source of this element. The essays were conducted in two steps. In the first, wheat plants between 37 and 41 days after seedling (d.a.s) were inoculated with a bacterial suspension ($OD_{540} = 0.05$ or $OD_{540} = 0.1$) to evaluate the following variables: incubation period (IP), latent period (LP), bacterial population dynamics *in plant* (BDP), electrolyte leakage (EE) and disease severity. The experiment was conducted once. In the second step, wheat plants between 37 and 41 d.a.s were inoculated with bacterial suspension ($OD_{540} = 0.1$) to quantify the activity of the enzymes chitinases (QUI), peroxydases (POX) and polyphenoloxydases (PFO). The concentration of total soluble phenolics (TSP) and lignin thioglycolic acid derivatives (LTAD) were also determined. Samples for microscopic analyses and also for Si and calcium concentration on leaves were collected for both assay steps. Foliar contents only differed significantly for Si variant. The variables IP, LP, BDP, EE, and disease severity did not differ significantly between plants supplied or not with Si. There were significant and punctual differences between plants supplied or not with Si regarding the enzymatic activity of POX, PFO and LTAD. Regarding the QUI activity, there were statistical differences between plants supplied or not with Si throughout the entire evaluation period. In this case, wheat plants not supplied with Si and infected with Xtu showed the highest enzyme activity. Scanning electron microscopy observations showed cuticle degradation and parenchyma tissue collapse in infected wheat leaf tissues. The observations from this study allowed to conclude that such structural injuries occurred as a result of Xtu infection. Silicon had not a great impact on enhance the mechanisms of resistance examined on this study.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O patossistema *Triticum aestivum* vs. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie monocotiledônea pertencente à família poaceae e que desde a sua domesticação, apresentou grande expansão mundial. É uma planta de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera. No Brasil a produção do cereal está concentrada nas regiões Sul (PR, RS e SC) e Sudeste (SP e MG) sendo introduzido, paulatinamente, nas regiões do cerrado brasileiro, sob irrigação ou sequeiro (Bacaltchuk *et al.*, 2006). De todas as espécies cultivadas (cereais, leguminosas e oleaginosas) em terras brasileiras na safra 2008, o trigo representou 4,1 % da produção nacional (Ibge, 2009). Dados do Ibge (2009) também têm demonstrado que apesar dos aumentos de produtividade deste cereal os volumes importados, anualmente, superam significativamente a produtividade nacional.

Dentre as doenças de etiologia bacteriana relatadas para a cultura no Brasil - a queima da bainha, o crestamento da folha ou branqueamento e a estria bacteriana, causadas pelas espécies, *Pseudomonas fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *syringae* e *Xanthomonas translucens*, respectivamente (Malavolta Jr. *et al.*, 2008) - a estria bacteriana do trigo destaca-se por ocasionar os maiores danos e perdas (Reis *et al.*, 2008). Vários patovares da bactéria *X. translucens* (*X. t.* pv. *cerealis*, *X. t.* pv. *secalis*, *X. t.* pv. *translucens* e *X. t.* pv. *undulosa*) são conhecidos como os agentes causais da estria bacteriana nos cereais de inverno (Bragard *et al.*, 1995; Malavolta Jr. *et al.*, 2008). Destes, somente *X. t.* pv. *cerealis*, *X. t.* pv. *translucens* e *X. t.* pv. *undulosa* infectam naturalmente as plantas de trigo e, apesar de ambos serem encontrados no Brasil, apenas o pv. *undulosa* encontra-se amplamente disseminado entre os estados produtores do grão (Malavolta Jr. *et al.*, 1998). Assim, consideraremos que a estria bacteriana do trigo, também denominada “bacterial leaf streak” ou “black chaff”, tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Smith, Jones & Reddy 1919) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (ISPP, 2008).

Apesar de sua ocorrência esporádica ao longo dos anos de cultivo, esta bacteriose do trigo encontra-se disseminada em todos os países produtores (EPPO, 2008). No Brasil é considerada uma doença importante no norte do Paraná, sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul. A redução no rendimento de grãos pode chegar a 40%.

Esta espécie é capaz de infectar o trigo, o triticale e o centeio, sobreviver interna e externamente nas sementes e em restos culturais (Reis e Casa, 2005; Reis *et al.*, 2008).

Os sintomas da doença são mais facilmente observados nos estádios de emborrachamento e espigamento, principalmente após a ocorrência de condições climáticas favoráveis (Mehta, 1993). Nas folhas, são observadas lesões aquosas (anasarca), estreitas e alongadas, tornando-se escuras. Sob alta umidade as lesões coalescem, destruindo grande extensão do limbo foliar. É possível constatar também a produção de pus bacteriano nos tecidos doentes. A bacteriose é denominada “black chaff” quando observada nas espigas e no pescoço. Em ataque severo pode provocar a esterilidade das espigas. A doença ocorre em temperatura variando de 15 a 30 °C, sendo a faixa ótima entre 18 e 22 °C. O período de incubação do patógeno, em condições artificiais de inoculação varia entre 4 e 14 dias após a inoculação. A bactéria é capaz de penetrar o tecido hospedeiro via estômatos e colonizar preferencialmente o tecido parênquimático das folhas (Duveiller *et al.*, 1997; EPPO, 2008).

A semente de trigo é a principal fonte de inóculo primário e o mais importante agente de dispersão e sobrevivência do patógeno. Em sementes armazenadas sob condições ideais a sobrevivência da bactéria é superior a três anos (Mehta, 1993). Lotes de sementes com valores menores que 1000 UFC/g de semente, não causam epidemia no campo (Schaad e Forster, 1985). Embora a taxa de transmissão da bactéria das sementes para a parte aérea seja baixa (Schaad, 1987), Mehta (1990) e Mehta e Bassoi (1993) constataram que quanto maior a contaminação das sementes, maior a porcentagem de área foliar infectada e maior a perda no rendimento de grãos. “Nas condições brasileiras ficou comprovado que a bactéria é transmitida exclusivamente por sementes e que não sobrevive no solo e em restos culturais por mais de cinco meses, provavelmente devido às altas temperaturas no verão” (Mehta, 1993). Dentro da lavoura sua disseminação ocorre por respingos de chuva, insetos, pelo tráfego de máquinas e implementos agrícolas e pelo homem (EPPO, 2008).

O controle do patógeno nas sementes de trigo pode ser realizado por tratamento com calor seco (72 °C/7 dias) (Fourest *et al.*, 1990) ou com produtos químicos como acetato cúprico acidificado a 0,5% (45 °C/20 minutos), guazatine plus (300 mL ou 400 g p.c./100 Kg de sementes) (Mehta e Bassoi, 1993) ou probenazole granulado (2 Kg i.a./ha) (Luz, 1993). O tratamento com calor seco não é viável para grandes quantidades de sementes e ainda, assim como o acetato cúprico acidificado, ocasiona redução no poder germinativo delas. A produção de sementes de trigo livres da

bactéria e a rotação com culturas não hospedeiras são as medidas de controle mais indicadas para essa bacteriose, já que pouco progresso tem sido obtido no desenvolvimento de cultivares resistentes (Reis e Casa, 2005). Neste contexto, a nutrição mineral de plantas destaca-se como aliada ao manejo integrado para o controle da estria bacteriana do trigo.

1.2. Silício no sistema solo-planta e no controle de doenças

Os nutrientes minerais exercem funções específicas no metabolismo vegetal, afetando o crescimento e a produtividade das culturas. Alteram a morfologia, a anatomia celular e a composição química das células, podendo aumentar ou reduzir a expressão da resistência das plantas aos patógenos. A resistência das plantas às doenças, apesar de geneticamente controlada, pode ser influenciada pelos fatores de ambiente. A nutrição mineral é, pois, um fator ambiental de fácil manipulação visando ao controle de doenças de plantas. Entretanto, é necessário conhecer como os nutrientes minerais afetam a resistência das plantas aos patógenos durante o processo de patogênese (Marschner, 1995).

O silício (Si), embora seja um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, não é considerado agronomicamente essencial, mas benéfico. Como tal, apresenta efeitos positivos somente para algumas espécies vegetais e sob condições especiais de cultivo (Marschner, 1995). Dentre os benefícios potencializados pelo Si às plantas podemos citar: aumento no conteúdo de fósforo nos tecidos vegetais devido à melhor disponibilidade desse elemento no solo e ou pela sua maior mobilidade das raízes para o colmo; melhora no aproveitamento da água com conseqüente diminuição na taxa de transpiração; aumento da rigidez das folhas, das bainhas foliares e do colmo, tornando-os mais eretos e com maior área fotossintética; redução no número de grãos quebrados e, por fim, maior tolerância a pragas e doenças (Epstein, 2001; Datnoff *et al.*, 2007).

O Si é um elemento mineral não encontrado livre na natureza e sim combinado com óxidos de Al, Fe e Mn, e silicatos $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ que totalizam 60% da fração sólida do solo. Solos tropicais e subtropicais sujeitos ao intemperismo intenso e lixiviação, cultivados em sucessão, tendem a apresentar baixos níveis de Si, num processo conhecido como dessilicificação. Embora o principal reservatório desse mineral seja a fase sólida do solo, a fonte para a absorção imediata de Si pelas raízes das plantas é a solução do solo onde o Si pode ser encontrado na forma de ácido monossilícico - H_4SiO_4 ,

com concentrações variando entre 3,5 e 40 mg Si L⁻¹ (Marschener, 1995; Epstein, 1999).

A absorção de Si pela planta é favorecida pela disponibilidade de água no solo, por aumentar a liberação dele na solução e favorecer o fluxo de massa até as raízes (Casey *et al.*, 2003). Uma vez absorvido, o Si (H₄SiO₄) é translocado para as folhas na forma de ácido silícico monomérico, sendo então, depositado abaixo da cutícula como um polímero hidratado – SiO₂.nH₂O (sílica amorfa ou opala). Do total de Si absorvido, 99% acumula-se no interior das plantas na forma de ácido silícico polimerizado (opala) e o restante, na forma coloidal ou iônica (Yoshida, 1965). Embora todas as plantas cresçam com o sistema radicular em contato com Si na solução do solo e este elemento possa estar em elevadas concentrações, o acúmulo na parte aérea das plantas varia significativamente, de 0,1 a 10% do peso da matéria seca. Isto se deve efetivamente à habilidade diferencial do sistema radicular das espécies em absorver o Si a partir da solução do solo (Ma e Yamaji, 2006; Mitani e Ma, 2005).

Inúmeros são os relatos na literatura mostrando redução na intensidade de importantes doenças em arroz e hortaliças com o uso do Si. Particularmente em arroz, importantes doenças fúngicas como a brusone (*Magnaporthe grisea*) – patossistema modelo nos estudos envolvendo Si - a mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus*), a podridão do colmo (*M. salvinii*), a escaldadura (*Monographella albescens*), a queima das bainhas (*Thanatephorus cucumeris*) e a descoloração dos grãos (espécies de *Bipolaris*, *Fusarium* e outros), tiveram suas intensidades significativamente reduzidas com a aplicação de Si no solo (Datnoff *et al.*, 1997; Savant *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2001, 2003). A literatura também registra o efeito positivo do Si no controle de doenças fúngicas em dicotiledôneas cultivadas comercialmente, principalmente em hidroponia, tais como o míldio pulverulento (*Podosphaera xanthii*) em abóbora, a podridão das raízes (*Pythium ultimum*) e a murcha-de-fusário (*Fusarium solani*) em pepino, o míldio pulverulento (*Uncinula necator*) da videira e o oídio (*Sphaeroteca pannos*) da roseira (Miyake e Takahashi, 1983; Bowen *et al.*, 1992; Menzies *et al.*, 1991; Chérif *et al.*, 1992; Bélanger *et al.*, 1995).

Os mecanismos de resistência morfológicos, citológicos, ultraestruturais, citoquímicos e ou bioquímicos conferidos pelo Si permanecem sendo investigados. Matichenkov. *et al.* (2008) quantificaram o ácido monossilícico e o ácido polisilícico - formas solúveis de Si - em diferentes órgãos de espécies vegetais do tipo C₃ e C₄ e constataram grande variação nos seus teores. Em função dos resultados obtidos os

autores concluíram: i) a absorção do Si se dá de maneira ativa, ou seja, a absorção do Si é maior que a absorção da água (Jones e Handreck, 1967); ii) o transporte do elemento no interior dos tecidos vegetais se dá sob a forma de ácido polisilícico e, iii) ambos participam de importantes processos químicos e bioquímicos (oxidação, redução, formação de grupos funcionais e etc) no interior dos tecidos vegetais.

Dentre as hipóteses comumente aceitas para explicar o aumento da resistência de determinado hospedeiro, mono ou dicotiledôneas, a um patógeno específico, tanto os impedimentos físico e químico devem ser considerados. Assim citamos: densidade de células silicificadas na epiderme (Ishiguro, 2001); deposição e polimerização do ácido silícico, abaixo da cutícula, formando uma dupla camada cutícula-sílica (Yoshida, 1965); fortificação da parede celular de células da epiderme (Kim *et al.*, 2001); acúmulo de compostos fenólicos - material osmiofílico e ou fitoalexinas (Rodrigues *et al.*, 2004); aumento na atividade de enzimas relacionadas à patogênese - quitinases, peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase (Chérif *et al.*, 1994; Fawe *et al.*, 1998, 2001; Jones, 1984).

Particularmente para trigo, uma espécie tipicamente acumuladora de silício (Rafi e Epstein, 1999; Casey *et al.*, 2003; Rains *et al.*, 2006), existem poucos relatos quanto à resistência conferida pelo Si às principais doenças. Bélanger *et al.* (2003) reportaram uma extensiva deposição de fenóis glicolizados, após marcação citoquímica com sonda específica, na parede das células da epiderme de trigo recebendo Si e colonizadas por *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, agente causal do oídio. A presença desses compostos também foi observada envolvendo a membrana extra-haustorial do fungo, comprometendo a absorção de nutrientes. Rémus-Borel *et al.* (2005) também verificaram a presença e acúmulo de compostos fungitóxicos (fenólicos e ou fitoalexinas) circundando as zonas de infecção (células vegetais parasitadas, em colapso) adjacentes aos haustórios e cadeias de conídios - após análise ultraestrutural (TLC e HPLC) e microscópica (luz e fluorescência) - somente em plantas de trigo infectadas com *B. graminis* f.sp. *tritici* e tratadas com Si.

Da mesma forma, estudos envolvendo o uso do Si como agente potencializador de resistência às fitobacterioses são raros. Chang *et al.* (2002) estudando o efeito do Si no patossistema arroz vs. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em ensaio no campo, constataram que as folhas das plantas submetidas a fertilização silicatada apresentaram maiores teores do elemento e menores teores de açúcares solúveis totais. Conseqüentemente, observaram menor taxa de multiplicação da bactéria nos tecidos

foliares e maior grau de resistência (inibição da epidemia) à mancha bacteriana. Estes autores concluíram também que o Si, isoladamente, não controlou a epidemia por completo, mas melhorou a resistência de campo.

Dannon e Wydra (2004) estudando o efeito do Si no controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em tomateiro, sob cultivo hidropônico, verificaram redução na incidência e na severidade da doença nos genótipos moderadamente resistente (MR) e resistente (R) fertilizados com o Si. Estes resultados foram confirmados posteriormente por Wydra *et al.* (2005) e por Diogo e Wydra (2007), nas mesmas condições, exceto o meio de cultivo que, nestes casos, além da hidroponia utilizaram substrato comercial sólido para o crescimento das plantas. Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nas respostas de defesa destes genótipos à fitobacteriose, Diogo e Wydra (2007) constataram, por meio de técnicas histoquímicas, que a redução na incidência e severidade da murcha bacteriana em cultivar de tomateiro moderadamente resistente e fertilizado com Si, ocorre devido às alterações na estrutura da parede celular dos vasos do xilema.

Dada a inexistência de alternativas viáveis e eficientes para o controle da estria bacteriana do trigo, a carência de estudos envolvendo a fertilização silicatada no manejo de fitobacterioses, o potencial de uso deste elemento e a importância econômica e social da triticultura brasileira, propusemo-nos estudar possíveis mecanismos de defesa potencializados pelo Si em plantas de trigo à infecção por *X. translucens* pv. *undulosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em de casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) e as análises das folhas de trigo foram realizadas nos Laboratórios de Interação Patógeno-Hospedeiro, Bacteriologia de Plantas II e no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, localizado na região da zona da mata de Minas Gerais, com latitude 20° 45' 14" S e longitude 42° 52' 53" W.

2.1. Material de solo

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

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

Análise Granulométrica				
Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe Textural
	dag kg ⁻¹			
34	6	7	53	Argiloso

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

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

2.2. Fonte e doses de silício

Como fonte de Si foi utilizado o produto comercial Vansil W-10 (volastonita; CaSiO_3), livre de contaminantes como o ferro e o fósforo. Este produto foi adquirido da Empresa Ipiranga Comercial Química, localizada no Estado de São Paulo. As características químicas desse produto são: Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT) de 77%, teor total em SiO_2 de 51,9% (= 24,2% de Si), e teor total em CaO de 43,4% (= 31,0% de Ca). As doses de volastonita (tratamentos) utilizadas foram de 0 e $1,25 \text{ g kg}^{-1}$ de solo, correspondendo, respectivamente, a 0 e $0,3 \text{ g de Si kg}^{-1}$ de solo. Ao solo correspondente à dose de 0 g kg^{-1} de volastonita adicionou-se $0,967 \text{ g}$ carbonato de cálcio kg^{-1} de solo (CaCO_3 , PRNT 100% e 40% Ca). Com este procedimento, o teor de Ca ficou padronizado em $0,387 \text{ g kg}^{-1}$ e somente o teor de Si sofreu variação em ambos tratamentos.

O solo, previamente acondicionado em sacos plásticos e após ter recebido a dose de volastonita ou de carbonato de cálcio, foi incubado por até 60 dias. Durante este período, a umidade foi mantida constante. Posteriormente, realizou-se a homogeneização e a coleta de amostras deste solo, para análise química. Assim, promoveu-se a correção de sua acidez elevando a saturação de bases (V) para 30% (Tabela 3).

Tabela 3. Características químicas determinadas antes da semeadura e após o período de incubação do material de solo do Latossolo Amarelo ácrico com as doses de volastonita e carbonato de cálcio.

Análise Química													
Volastonita	CaCO_3	pH	P	K	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H+Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	m
-----g/vaso-----		H_2O	-mg/dm ³ -			-----				cmol/dm ³ -----		----%--	
0,00	0,967	6,2	1,1	9	1,19	0,0	0,0	3,7	1,21	1,21	4,91	24,6	0,0
1,25	0,000	5,8	1,1	9	1,00	0,0	0,0	4,0	1,02	1,02	5,02	20,3	0,0

2.3. Cultivar de trigo e adubação das plantas

Neste trabalho utilizou-se a cultivar BR18 (padrão de suscetibilidade), de acordo com Sousa (2002), obtida na Embrapa Trigo – Passo Fundo, RS. Seis sementes de trigo, desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos e lavadas em água corrente, foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 kg de solo

dos respectivos tratamentos, 0 ou 0,30 g de Si kg⁻¹ de solo. A adubação de plantio foi realizada aplicando-se 1,63 g de fosfato de cálcio (CaPO₄) kg⁻¹ de solo, no dia da semeadura. Logo após a emergência, as plântulas foram desbastadas para três plantas por vaso. Adubações semanais foram realizadas até o momento das inoculações. Nas duas primeiras adubações utilizou-se o adubo Ouro Verde[®] a 4 g L⁻¹ (30 mL kg⁻¹ solo) e nas demais, a seguinte solução nutritiva (30 mL kg⁻¹ solo): 192 mg de KCl (cloreto de potássio) kg⁻¹ de solo ; 104,42 mg de K₂SO₄ (sulfato de potássio) kg⁻¹ de solo; 150,35 mg de MgSO₄ (sulfato de magnésio) kg⁻¹ de solo; 61 mg de (NH₂)₂CO (uréia) kg⁻¹ de solo; 100 mg NH₄NO₃ (nitrato de amônio) kg⁻¹ de solo; 0,27 mg de NH₄MO₇O₂₄ (molibdato de amônio) kg⁻¹ de solo; 1,61 mg de H₃BO₃ (ácido bórico) kg⁻¹ de solo; 6,67 mg de ZnSO₄ (sulfato de zinco) kg⁻¹ de solo; 1,74 mg de CuSO₄ (sulfato de cobre) kg⁻¹ de solo; 4,1 mg de MnCl₂ (cloreto de manganês) kg⁻¹ de solo; 4,08 mg de FeSO₄ (sulfato ferroso) kg⁻¹ de solo e 5,58 mg de C₁₀H₁₆N₂O₈ (ácido etilenodiamino tetracético – EDTA) kg⁻¹ de solo. O FeSO₄, juntamente com o EDTA, foram fornecidos somente nas terceira e quarta adubações. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 20-28°C e 50-80% de umidade relativa.

2.4. Caracterização do isolado de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* e inoculação das plantas de trigo

O isolado de Xtu utilizado neste trabalho, de código IBSBF 579 - “strain type”, foi obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – Campinas, SP. Para a repicagem e preparo do inóculo utilizou-se o meio 523 de Kado & Heskett (1970). As culturas bacterianas foram incubadas a 28 ± 1°C, por 36-48 horas, para o crescimento das células bacterianas. O isolado 579 foi preservado em tubos contendo meio YDC - Yeast Dextrose Carbonate (Wilson et al., 1967).

O inóculo foi preparado como segue: em placas de Petri contendo o meio 523, solidificado, foi semeado 100 µL de uma suspensão de células de Xtu, previamente incubadas em meio 523 líquido. A suspensão foi espalhada sobre a superfície do meio com o auxílio de uma espátula de Drigalsky. As placas semeadas foram mantidas a 28 ± 1°C por 48 horas. Após este período ressuspendeu-se as colônias bacterianas com solução salina estéril a 0,85%, obtendo-se uma suspensão fortemente turva. A concentração desta suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro modelo “Spectronic 20” para OD₅₄₀= 0,05 (experimento I) e OD₅₄₀= 0,1(experimento II).

Plantas de trigo com 37-41 dias após a semeadura, que de acordo com escala de Feekes-Large (Mehta, 1993) encontravam-se no estágio 8 de desenvolvimento vegetativo foram inoculadas com as suspensões preparadas anteriormente, por atomização sob pressão com auxílio de um atomizador manual do tipo aerógrafo, modelo “VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, USA”. As folhas efetivamente inoculadas, em cada repetição, encontravam-se completamente expandidas e, após selecionadas, tiveram suas extremidades identificadas com fita adesiva, dois dias antes da inoculação. Assim, inocularam-se de 12 a 15 folhas por repetição. Plantas atomizadas com solução salina esterilizada a 0,85% constituíram as testemunhas. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 h antes e após a inoculação.

2.5. Quantificação dos componentes de resistência

2.5.1. Período de incubação (PI) e período latente (PL)

Os experimentos para a avaliação dos componentes de resistência foram instalados segundo um esquema fatorial 2 x 2 e analisados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os fatores estudados foram: doses de Si (0 e 1,25 g de volastonita kg⁻¹ de solo) e concentração do inóculo (experimento I e experimento II). Cada unidade experimental foi composta de um vaso plástico contendo 1 kg de solo e três plantas de trigo. Os experimentos foram repetidos uma vez.

O PI e o PL – intervalo em dias entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas (anasarca) da estria bacteriana do trigo e dos sinais (exsudação das células bacterianas), respectivamente, foram avaliados a cada um dia após a inoculação (DAI) nas folhas inoculadas (experimento I e experimento II) das plantas de trigo supridas ou não com Si.

2.5.2. Dinâmica populacional *in planta* de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*

Para monitorar a população bacteriana de Xtu *in planta*, foi realizado o método da diluição em série e contagem das colônias em placas de Petri, conforme descrito por Silva-Lobo *et al.* (2005), com modificações.

Segmentos foliares inoculados (extremidade da folha) foram coletados ao longo do PI e do PL da Xtu para o monitoramento da DP. O PI e o PL da bactéria foram representados pelas épocas de coleta: 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 DAI para o experimento I e 0, 2, 4, 7 e 10 DAI para o experimento II. Cada segmento foliar foi pesado (g) e mantido sob

refrigeração (5°C) até sua análise. Cada segmento foliar foi submetido à desinfestação superficial, maceração e diluição seriada. Para isto, foram imersos em uma solução alcoólica a 50% por um minuto e, em seguida, em uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 30-40 segundos. Imediatamente após esta etapa passaram por uma tríplice lavagem em água destilada e esterilizada, e foram macerados em almofariz esterilizado contendo solução salina esterilizada 0,85% (mL) na proporção de 1:10 (p:v). De cada macerado, com auxílio de uma alça calibrada, pipetou-se 10 µL, que foram homogeneizados em 990 µL de solução salina estéril a 0,85% + Tween 80 a 0,02%, contidos em tubos de ensaio. Posteriormente, diluições sucessivas foram realizadas, sendo finalizadas em 10⁻⁶.

Em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo XTS ágar (nutriente ágar a 23 g/L; glucose a 5 g/L; cicloheximida a 100 mg/mL; gentamicina a 10 mg/mL e cefalexina a 10 mg/mL) (Schaad et al., 2001) foram espalhados 10 µL de cada diluição sobre a superfície do meio. As placas foram mantidas a 28°C, por quatro dias e após este período, procedeu-se a contagem do número de colônias. Os dados obtidos em cada época de coleta foram submetidos à transformação logarítmica (Log₅ UFC g⁻¹ folha) e utilizados para expressar a DP de Xtu nas folhas de trigo infectadas.

2.5.3. Extravasamento de eletrólitos (EE) do tecido hospedeiro

Para quantificar o EE, em porcentagem, no tecido foliar das plantas de trigo, supridas ou não com Si e inoculadas ou não com Xtu, utilizou-se a metodologia proposta por Lima *et al.* (2002), com modificações. Um total de 23 discos de folhas, de 8 mm de diâmetro, foram coletados ao longo do PI e do PL de Xtu. Cada grupo de 23 discos de folhas representou uma amostra, ou seja, uma repetição de cada tratamento. O PI e o PL da bactéria foram representados pelas épocas de coleta 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 DAI para o experimento I e 0, 2, 4, 7 e 10 DAI para o experimento II. Após o corte, os discos obtidos foram imediatamente lavados, por duas vezes, em água destilada. Posteriormente, foram transferidos para pesa-filtros contendo 60 mL de água destilada onde permaneceram por quatro horas à temperatura ambiente. Após este período, procedeu-se a primeira leitura da condutividade elétrica das amostras - CE1 (microohms/h), em condutivímetro marca “Tecnocon mCA-150 - MS Tecnocon Instrumentação Científica”. Em seguida, as amostras foram submetidas à temperatura de 90°C por duas horas, sendo então, após o resfriamento das mesmas, determinado o segundo valor de condutividade elétrica - CE2. O valor do extravasamento de eletrólitos

foi obtido pela porcentagem de eletrólitos extravasados em relação aos eletrólitos totais, conforme a fórmula: $EE (\%) = (CE1/CE2)*100$.

2..5.4. Severidade real da estria bacteriana do trigo

Aos 15 DAI, folhas de trigo apresentando os sintomas típicos da estria bacteriana foram coletadas e digitalizadas, na resolução de 300 dpi. Foram analisadas oito folhas de cada tratamento e repetição. As imagens obtidas foram processadas no programa QUANT 1.0 (Vale *et al.*, 2003) para obtenção do percentual da área foliar lesionada.

2.6. Determinação da atividade de enzimas relacionadas com a defesa da planta a patógenos

Para determinar a atividade das enzimas quitinases, peroxidases e polifenoloxidasas, folhas de trigo foram inoculadas com a bactéria Xtu ($OD_{540} = 0,1$) e coletadas aos 0, 3, 6, 9 e 12 DAI. Cada amostra foi composta por quatro folhas inteiras, uma de cada repetição e tratamento. As amostras foram colocadas em pacotes de papel alumínio e imediatamente congeladas em N_2 líquido, sendo armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até análise. De cada amostra foi obtido um extrato foliar e os ensaios foram realizados em triplicatas. Este experimento foi conduzido uma única vez.

2.6.1. Quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por Lanna *et al.* (1996). As amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N_2 líquido. Em seguida, foram trituradas em almofariz até a obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p:v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM, na proporção de 1:3 (p:v), isto é, a cada 1 g de material vegetal foram adicionados 3 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pequeno pedaço de gaze e realizou-se a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 20.000 x g; temperatura: 4°C ; tempo: 25 minutos. O sobrenadante (extrato bruto) foi armazenado a 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas (Warburg e Christian, 1941).

A atividade das quitinases nas amostras foi determinada conforme método descrito por Yedidia *et al.* (1999). A mistura de reação, que foi incubada a 37°C por 2 horas, continha 470 µL do tampão para reação acetato de sódio 50 mM pH 5,0, 10 µL da solução de substrato *p*-nitrofenil-β-D-*N,N'*-diacetilquitobiose (PNP) 2 mg mL⁻¹ e 20 µL do extrato vegetal. Após esse período, foram acrescentados 0,5 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,2 M. Posteriormente, as amostras tiveram a absorvância determinada no comprimento de onda 410 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. Subtraiu-se o valor de absorvância de cada amostra do valor de absorvância do controle (uma mistura idêntica à da amostra, com a reação paralisada no início) (Pereira, 2007). A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 7 x 10³ mM⁻¹ cm⁻¹. Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em atividade específica (M.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína).

2.6.2. Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por Peixoto (1998). As amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas no almofariz até a obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p:v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de potássio 100 mM pH 6,8, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 0,1 mM, na proporção de 1:20 (p:v), isto é, a cada 1,0 g de material vegetal foram adicionados 20 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pedaço de gaze e realizou-se a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 15 minutos. O sobrenadante (extrato bruto) foi armazenado a 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas (Warburg e Christian, 1941).

A atividade das peroxidases nas amostras foi determinada conforme método descrito por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação, que continha 950 µL de água destilada, 750 µL do tampão para reação fosfato de potássio 100 mM pH 6,8, 600 µL da solução de substrato pirogalol 100 mM e 600 µL da solução de substrato peróxido de

hidrogênio 100 mM, foi levada ao banho-maria à temperatura de 25°C para estabilização, por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 100 µL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 420 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 5 minutos em intervalos de 60 segundos (Pereira, 2007). Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em atividade específica (M .min⁻¹.mg⁻¹ de proteína).

2.6.3. Polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1)

A obtenção do extrato foliar foi feita segundo metodologia descrita por Peixoto (1998). As amostras de folhas foram pesadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. Em seguida, foram trituradas em almofariz até a obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p:v), ou seja, 1 g de PVPP para cada 100 mL de meio de extração adicionado. Posteriormente, macerou-se em tampão para extração fosfato de potássio 100 mM pH 6,8, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM, na proporção de 1:10 (p:v), isto é, a cada 1 g de material vegetal foram adicionados 10 mL de tampão. Preparou-se uma seringa com um pedaço de gaze e realizou-se a filtração do macerado obtido para tubos de centrífuga. Estabilizou-se a centrífuga nas condições necessárias, a saber: velocidade: 12.000 x g; temperatura: 4°C; tempo: 15 minutos. O sobrenadante (extrato bruto) foi armazenado a 4°C para posterior detecção da atividade enzimática. Uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação da concentração de proteínas (Warburg e Christian, 1941).

A atividade das polifenoloxidasas nas amostras foi determinada conforme método descrito por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação, que continha 1550 µL de água destilada, 750 µL do tampão para reação fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 e 600 µL da solução de substrato pirogalol 100 mM foi levada ao banho-maria à temperatura de 25°C para estabilização, por aproximadamente 4 minutos. Ao meio de reação foram adicionados 100 µL do extrato vegetal e, então, o aumento na absorbância foi registrado no comprimento de onda 420 nm em um ensaio colorimétrico no

espectrofotômetro durante um período de 5 minutos em intervalos de 60 segundos (Pereira, 2007). Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $2,47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955). Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e foram expressos em atividade específica ($\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína).

2.7. Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos

Para determinar a concentração dos compostos fenólicos solúveis totais e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico, folhas de trigo foram inoculadas com a bactéria Xtu ($\text{OD}_{540} = 0,1$) e coletadas aos 0, 3, 6, 9 e 12 DAI. Cada amostra foi composta por quatro folhas inteiras, uma de cada repetição e tratamento. As amostras foram colocadas em pacotes de papel alumínio e imediatamente congeladas em N_2 líquido, sendo armazenadas a -80°C até análise. Os ensaios foram realizados em triplicatas e este experimento foi conduzido uma única vez.

2.7.1. Compostos fenólicos solúveis totais (CFST)

Amostras representativas, de 0,1 g do material, foram maceradas em N_2 líquido. O macerado foi transferido para tubos tipo Eppendorf, homogeneizado com 1,5 mL de metanol 80% e ácido ascórbico a 1,7% (p:v) e extraído durante 4 horas a temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) em mesa agitadora a 200 rpm. Os tubos Eppendorf foram cobertos com papel alumínio para minimizar a oxidação dos compostos fenólicos. O extrato metanólico, de coloração amarela, foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 5 minutos e, após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf e o resíduo mantido a -80°C , para posterior determinação do teor de lignina. A metodologia proposta por Zieslin e Ben-Zaken (1993), com algumas modificações, foi usada para a determinação do teor de fenóis solúveis totais. Um volume de 150 μl do reagente Folin & Ciocalteu's Phenol 0,25 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado a 150 μl do extrato metanólico. A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) por 5 minutos. Posteriormente, 150 μl de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 M foi adicionado a mistura, a qual foi homogeneizada novamente e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido esse período, adicionou-se 1 mL de água destilada à mistura que permaneceu em temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$)

por 30 minutos. A absorvância das amostras foi medida, após prévia diluição (1:5), a 725 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP 2000UV – BEL Photonics). O teor de compostos fenólicos solúveis totais foi expresso em mg de compostos fenólicos (equivalente de catecol) kg^{-1} de tecido foliar fresco utilizando-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de catecol.

2.7.2. Teor dos derivados da lignina ácido tioglicólico (LATG)

Um volume de 1,5 mL de água destilada e esterilizada foi adicionado ao resíduo obtido após a extração dos compostos fenólicos solúveis totais. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 3 minutos, repetida por 3 vezes. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 60°C por \approx 12 h. O resíduo alcólico-insolúvel seco contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foram usados para determinação de lignina de acordo com os métodos de Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 mL da solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em HCl 2 N 1:10 foi adicionado ao resíduo seco. Os tubos Eppendorf foram levemente agitados para hidratar o resíduo e, em seguida, foram colocados em banho-maria (100°C) por 4 horas. Após esse período, os tubos Eppendorf foram colocados no gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 12,000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada estéril com centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaOH 0,5 N. A mistura permaneceu sobre mesa agitadora (200 rpm) por 12 horas a temperatura ambiente (\approx 25°C). A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf. Após a adição de 200 μ l de HCL concentrado ao sobrenadante, os tubos Eppendorf foram transferidos para uma bandeja com gelo e mantidos na geladeira (4°C) por 4 horas para precipitação dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. Após a centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, de cor laranja-amarronzado, foi dissolvido em 2 mL de NaOH 0,5 N. A leitura da absorvância foi realizada a 290 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP 2000UV – BEL Photonics). A concentração dos derivados da LATG foi expressa em g g^{-1} de tecido seco de folha utilizando-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

2.8. Análise do teor foliar de silício e cálcio

Ao término dos experimentos toda a parte aérea das plantas de trigo, supridas ou não com Si e inoculadas ou não com a Xtu, foram coletadas para determinação do teor foliar de Si e Ca. O material vegetal foi seco em estufa com ventilação forçada de ar a 65°C por 72 horas, e depois triturado em moinho tipo Wiley equipado com peneira de 20 mesh. A metodologia proposta por Körndorfer *et al.* (2004) foi utilizada para determinar o teor foliar de Si (g Kg⁻¹). As análises de Si foram realizadas no Laboratório de Análise Foliar e de Fertilizantes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, MG. O teor de Ca (g Kg⁻¹), por sua vez, foi determinado por digestão nitroperclórica e espectrofotometria de absorção atômica (Silva, 1999) no Laboratório de Análises de Solos Viçosa Ltda, em Viçosa, MG.

2.9. Análises Estatísticas

Os dados referentes a cada variável e época de coleta, dentro de cada experimento, foram submetidos ao cálculo de suas respectivas médias. Objetivando verificar a significância entre os tratamentos, aplicou-se o teste-t, ao nível de 5% de probabilidade.

2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O preparo das folhas de trigo para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi baseado na descrição de Lins *et al.* (2007), com modificações. Amostras de folhas foram coletadas aos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação, cortadas em fragmentos de ±0,5 cm², transferidos para frascos contendo 3 mL de fixativo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por um período mínimo de 24 horas a 5°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por três vezes, 15 minutos cada, com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e, subseqüentemente, imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), por uma hora e trinta minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada três vezes, por 15 minutos e, em seguida, desidratadas em série etanólica crescente (30, 50, 70, 80, 90, 95 % - por 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers TEC-030) para completar a secagem pelo método do ponto crítico do CO₂. Após completar a etapa de desidratação, as amostras foram divididas, sendo, uma parte montada em “stubs” (cilindros de alumínio com 12 mm de diâmetro cobertos,

previamente, com fita adesiva dupla face para a aderência das amostras) e submetida à remoção cuidadosa da cutícula foliar com auxílio de fita adesiva. A outra parte das amostras foi fragmentada transversalmente com auxílio de uma lâmina de barbear nova (sub-amostras de ~1 mm de altura). Os fragmentos foram dispostos sobre os “stubs” com a face cortada voltada para cima. Em seguida, todas as amostras foram cobertas com 20 nm de ouro, em aparelho Balzers FDU-010 (Metalizador). As condições de trabalho foram de 20 kv a uma distância de até 24 mm. As amostras foram observadas no MEV LEO VP1430, e as imagens depois de gravadas foram processadas no software Photopaint do pacote Corel Draw.

3. RESULTADOS

3.1. Teor foliar de silício e cálcio

Para as concentrações foliares de Si e Ca verificou-se diferença significativa apenas para o fator Si. A concentração foliar de Si nas plantas de trigo sadias ou infectadas com a Xtu (doente) supridas com Si foi 97% superior ao observado para as plantas não supridas com este elemento (Fig. 1).

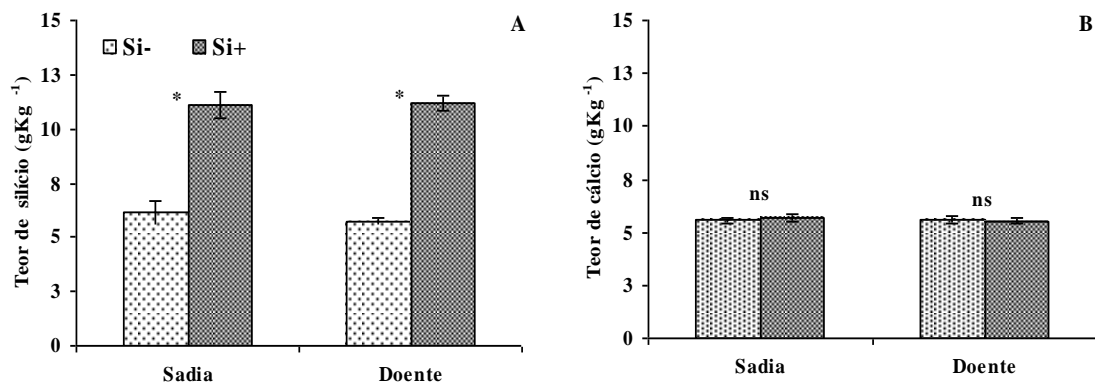


Figura 1. Teor foliar de silício (A) e cálcio (B) em plantas de trigo, cultivar BR18, inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Doente) ou não inoculadas (Sadia) e supridas (Si+) ou não (Si-) com silício. Cada coluna representa a média de nove plantas por tratamento. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade entre as médias de plantas supridas ou não com Si.

3.2. Quantificação de alguns componentes de resistência

3.2.1. Período de incubação (PI) e período latente (PL)

Não houve diferença entre os tratamentos quanto à determinação dos PI e PL da estria bacteriana do trigo. Os primeiros sintomas (anasarca) e sinais (exsudação) da doença tornaram-se evidentes a partir do quarto DAI nas plantas de trigo supridas ou não com o elemento Si. Somente aos seis DAI 100% das folhas inoculadas apresentaram-se com sintomas (Fig. 2). Nas condições experimentais testadas as lesões típicas da estria bacteriana do trigo surgiram preferencialmente, nos bordos e nas extremidades das folhas inoculadas como pontos encharcados – anasarca (Fig. 2A) que rapidamente evoluíram para extensas áreas necróticas circundadas por halos cloróticos (Fig. 2B e 2C).

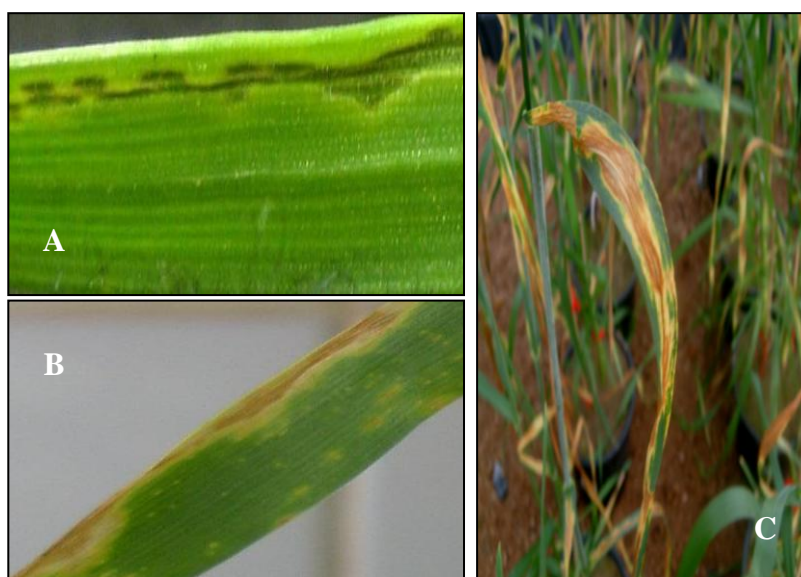


Figura 2. Formação de anasarca (A) e necrose circundada por halo clorótico (B e C), sintomas típicos da estria bacteriana, em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18, inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* e não supridas com silício.

3.2.2. Dinâmica populacional *in planta* da *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*

A multiplicação da bactéria nas folhas de trigo apresentou a mesma dinâmica ao longo do tempo independentemente da concentração de inóculo atomizado (experimento I ou II) sobre as folhas das plantas de trigo (Fig. 3), como também, pela presença (Si+) e ou ausência (Si-) de Si. Resultados semelhantes foram observados quanto às maiores populações bacterianas, obtidas a partir do sétimo DAI.

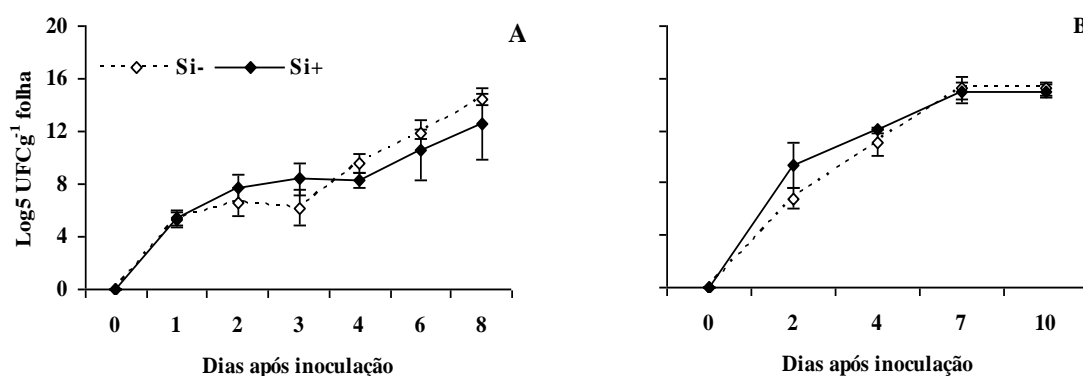


Figura 3. Dinâmica populacional de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício (Si) e atomizadas com suspensão de inóculo ajustada para OD₅₄₀ = 0,05 (A) e OD₅₄₀ = 0,1 (B). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

3.2.3. Extravasamento de eletrólitos pelo tecido hospedeiro (EE)

Os valores de EE apresentaram-se constantes durante as fases anteriores ao aparecimento dos primeiros sintomas e sinais da bactéria, ou seja, até os quatro (experimento II) ou seis DAI (experimento I). A partir de então, os valores aumentaram significativamente atingindo perda máxima aos 10 DAI. Embora os valores de EE das plantas supridas com Si terem sido ligeiramente superiores, em praticamente todo o período de avaliação, estes não foram estatisticamente diferentes dos observados nas plantas não supridas com este elemento (Fig. 4).

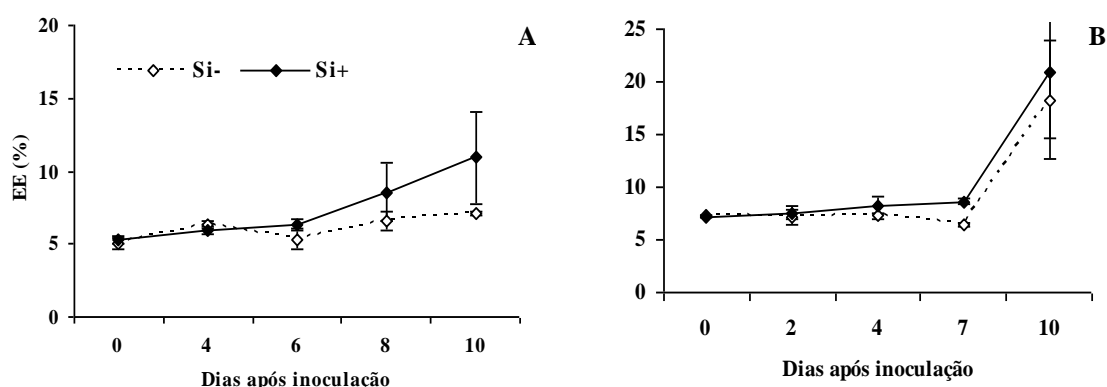


Figura 4. Extravasamento de eletrólitos (EE) em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18, supridas (Si+) ou não (Si-) com silício (Si) e atomizadas com uma suspensão da bactéria *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* ajustada para OD₅₄₀ = 0,05 (A) ou OD₅₄₀ = 0,1 (B). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

3.2.4. Severidade real da estria bacteriana do trigo

Após a análise das imagens pelo programa Quant 1.0 (Fig. 5) e obtenção da severidade real da estria bacteriana do trigo expressa em percentuais de área foliar (AF) necrótica, AF clorótica e AF necrótica + AF clorótica, para os respectivos tratamentos, concluiu-se ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste-t, que diferenças significativas foram observadas apenas para a AF clorótica das folhas sintomáticas (Fig. 6). As plantas de trigo não supridas com Si (Si-) e infectadas pela Xtu apresentaram as maiores porcentagens de AF clorótica. Nas plantas supridas com o elemento Si (Si+) houve uma redução de 50,23% na AF clorótica.

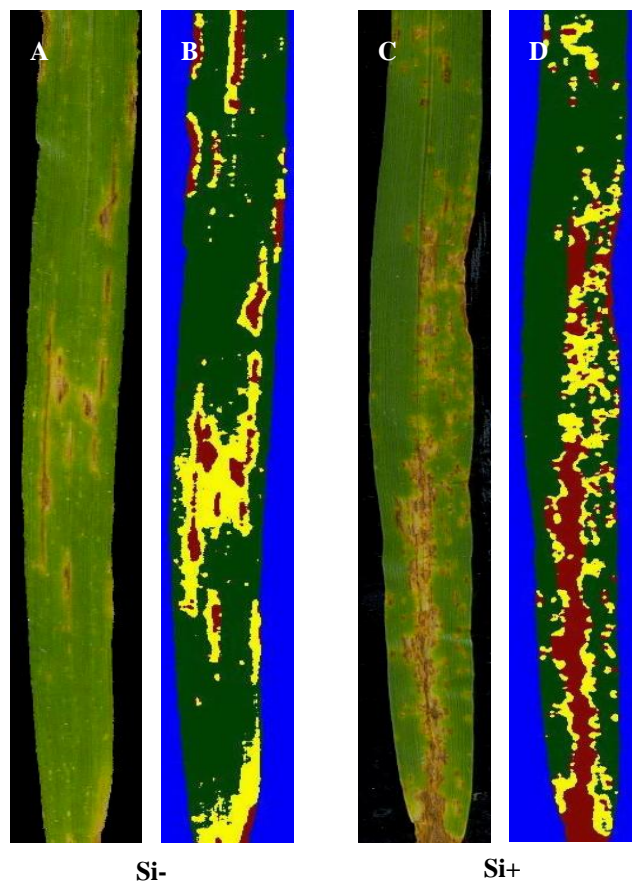


Figura 5. Severidade real da estria bacteriana do trigo em folhas de plantas da cultivar BR18, aos 15 DAI com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. A e C: imagens originais; B e D: imagens após análise no Quant 1.0.

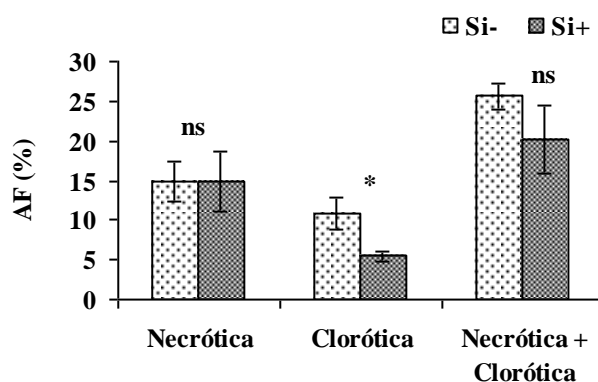


Figura 6. Área foliar (AF) necrótica e clorótica de plantas de trigo da cultivar BR18, inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* e supridas (Si+) ou não (Si-) com silício. Cada coluna representa a média de oito folhas por repetição (n=32). Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa, pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre as médias das plantas Si+ ou Si-.

3.3. Atividade de enzimas relacionadas com a defesa da planta

3.3.1. Quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)

Ao longo das avaliações, verificou-se diferença significativa na atividade de quitinases entre plantas de trigo supridas (Si+) e não supridas (Si-) com silício (Figura 7). Após a inoculação (0 DAI), tanto no tratamento Si+ como no Si-, registrou-se um ligeiro decréscimo na atividade destas enzimas, ao passo que, a partir do terceiro DAI um aumento de atividade foi registrado. A partir do sexto DAI acentuada queda na atividade destas enzimas foi observada nas plantas não supridas com silício. Nas plantas supridas com silício a atividade de quitinases permaneceu constante em praticamente todo o período avaliado. Aos nove e doze DAI a atividade de quitinases nas plantas supridas com silício foram significativamente superiores às das plantas não supridas com este elemento.

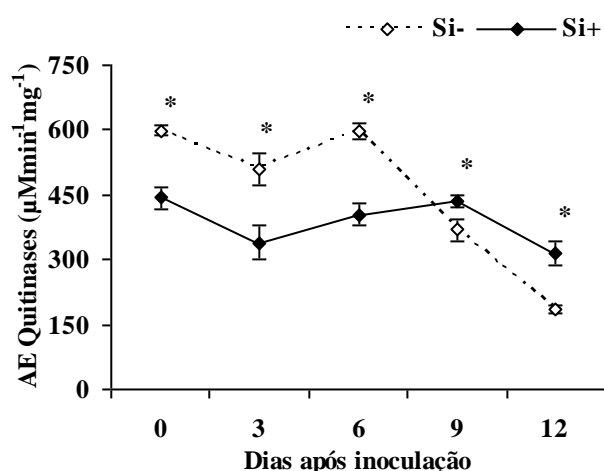


Figura 7. Atividade específica (AE) de quitinases em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Cada ponto representa a média de três repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

3.3.2. Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

Verificou-se que o aumento da atividade de peroxidases se deu após a inoculação da bactéria (Figura 8). Tanto em plantas supridas ou não com Si este aumento se deu até o terceiro DAI. Nas plantas supridas com Si, o pico de atividade foi alcançado aos três dias após a inoculação e a partir daí, permaneceu constante durante todo o período de avaliação. Nas folhas de trigo inoculadas com a bactéria e não

supridas com Si, a atividade das enzimas peroxidases foram sempre superiores em relação à atividade nas plantas supridas com Si porém, as maiores atividades foram significativas apenas aos três e seis DAI. Após este período, a atividade de peroxidases sofreu uma ligeira queda com tendência a se manter constante, se igualando à atividade de peroxidases nas plantas supridas com silício.

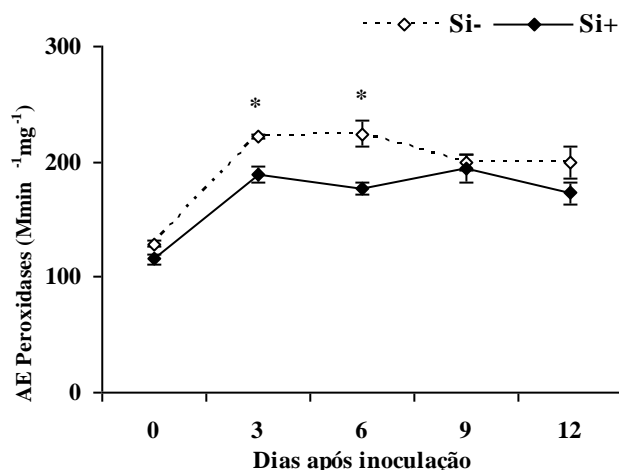


Figura 8. Atividade específica (AE) de peroxidases em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Cada ponto representa a média de três repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

3.3.3. Polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1)

Com a inoculação da bactéria nas plantas de trigo registrou-se queda na atividade de polifenoloxidasas, sendo esta mais evidente nas folhas das plantas supridas com Si (Fig. 9). Aos seis DAI a atividade de polifenoloxidasas foram significativamente superiores nas folhas das plantas de trigo não supridas com Si. Após este período, houve acentuada queda, passando a atividade constante dos nove aos doze DAI. Aos nove e doze DAI a atividade das polifenoloxidasas nas plantas supridas com Si foram significativamente superiores às das plantas não supridas com este elemento.

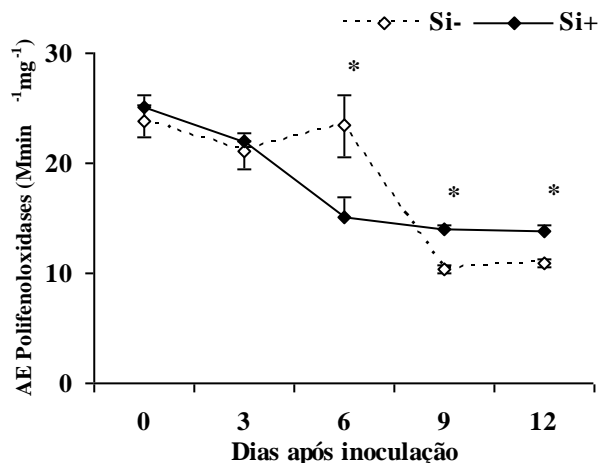


Figura 9. Atividade específica (AE) de polifenoloxidasas em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Cada ponto representa a média de três repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

3.4. Determinação da concentração de compostos relacionados com a defesa de plantas a patógenos

3.4.1. Compostos fenólicos solúveis totais (CFST)

Não houve diferença significativa nos teores dos CFST entre as plantas de trigo supridas ou não com silício e inoculadas com Xtu (Figura 10). Ambas as curvas apresentaram o mesmo comportamento e tendência constante.

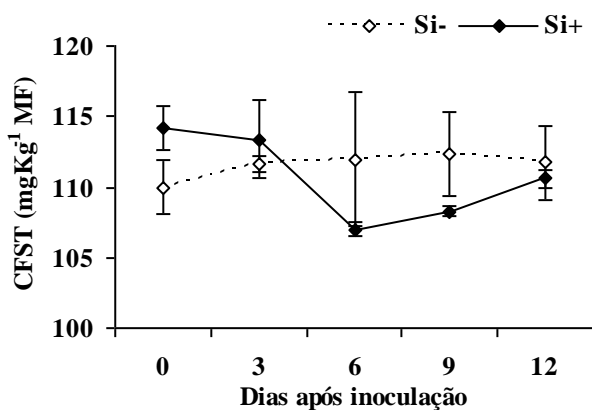


Figura 10. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Cada ponto representa a média de três repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

3.4.2. Teor dos derivados da lignina ácido tioglicólico (DLATG)

O teor dos DLATG apresentou um ligeiro acréscimo entre os terceiro e sexto DAI, e um ligeiro decréscimo entre os sexto e nono DAI, para ambos os tratamentos (Figura 11). A partir do nono DAI, os teores de DLATG foram significativamente superiores nas plantas de trigo infectadas por Xtu e não supridas com silício.

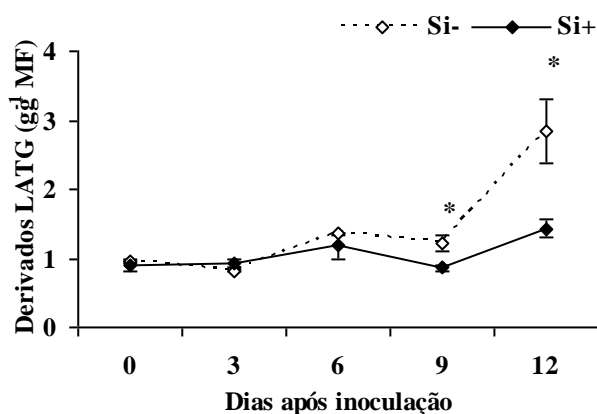


Figura 11. Concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) em folhas de plantas de trigo da cultivar BR18 supridas (Si+) ou não (Si-) com silício e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Cada ponto representa a média de três repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ao nível de 5% de probabilidade, entre médias de plantas supridas ou não com Si.

3.5. Análise de correlação de Pearson

Houve correlação significativa e negativa entre a concentração foliar de Si e a AFC, a atividade das POX e o teor dos DLATG (Tabela 4). Para os demais componentes avaliados, assim como, para a concentração foliar de Ca, não houve correlação significativa com a concentração foliar de Si.

Tabela 4. Coeficientes da correlação de Pearson entre a concentração foliar de Silício e os componentes de resistência dinâmica populacional *in planta* (DP), extravasamento de eletrólitos (EE), área foliar necrótica (AFN), área foliar clorótica (AFC), quitinases (QUI), peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina ácido tioglicólico (DLATG).

Componentes de resistência vs. Concentração de Si	Coefficiente de correlação (r)
DP	0,14 ^{ns}
EE	0,07 ^{ns}
AFN	-0,67 ^{ns}
AFC	-0,96 [*]
QUI	-0,25 ^{ns}
POX	-0,91 [*]
PFO	-0,02 ^{ns}
CFST	-0,33 ^{ns}
DLATG	-0,34 [*]
* = significativo ao nível de 5% de probabilidade	^{ns} = não significativo

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

As observações ao microscópio eletrônico de varredura não revelaram a presença de células e ou microcolônias bacterianas de *X.translucens* pv. *undulosa*. Estes resultados foram registrados em todas as épocas de coleta (0, 3, 6, 9 e 12 DAI), em ambos os tratamentos (plantas de trigo supridas ou não com silício e inoculadas ou não com a Xtu) e em ambas as posições histológicas (remoção da cutícula ou corte transversal) examinadas. As imagens apresentadas (Figura 12) ilustram basicamente a ocorrência de degradação de cutícula e o colapso do tecido parênquimático.

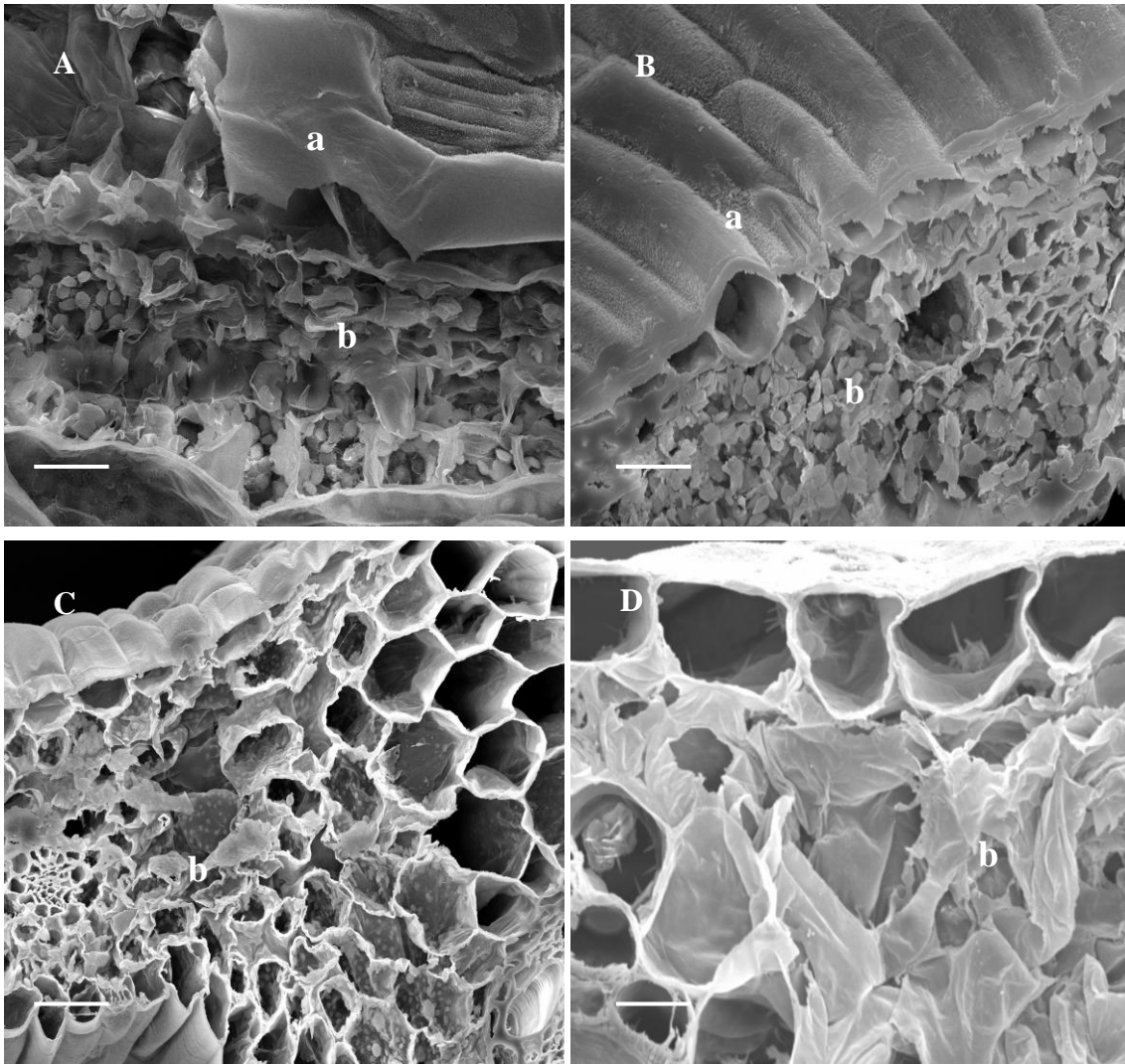


Figura 12. Eletromicrografias de varredura da região cuticular (a) e do tecido parenquimático colapsado (b) das folhas de plantas de trigo inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*, não supridas com silício (Si-), aos nove DAI. Barras em A e D = 10 µm e Barras em B e C = 20 µm.

4. DISCUSSÃO

Embora o período latente (PL) de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu) possa variar consideravelmente (4 a 10 DAI) em função das condições ambientais (Duveiller e Maraite, 1995), o maior ou o menor intervalo de tempo entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas da estria bacteriana do trigo, também é função da concentração inicial da bactéria sobre as folhas de trigo (Stromberg et al., 1999). Para Duveiller e Maraite (1995), quanto maiores a temperatura e a umidade relativa, menor é o PL e maior é a severidade da doença. Complementarmente, Stromberg et al. (1999) verificaram que o PL da doença só se define quando elevadas concentrações da mesma são alcançadas na filosfera das folhas. Constataram, assim, correlação positiva entre quantidade inicial de inóculo e PL. O mesmo não foi confirmado para a severidade final da doença. Os autores observaram que inoculando-se suspensões bacterianas mais ou menos concentradas sobre as folhas de trigo, o resultado final de severidade da doença não diferia estatisticamente. Stromberg et al. (2004) testaram, sem sucesso, a interferência de bactérias antagonistas sobre o estabelecimento da população de Xtu e, conseqüentemente, na redução da severidade da estria bacteriana do trigo. Nas condições experimentais do presente trabalho, verificou-se que os resultados obtidos corroboram, em parte, aos dos autores supracitados. Destacamos, porém, que o PL da estria bacteriana do trigo foi o mesmo (4 DAI), independentemente da concentração de Xtu inoculada sobre as plantas. O que tornou possível este comportamento foi o fato de o patógeno ter sido inoculado sob pressão, o que garantiu sua presença no interior dos tecidos do hospedeiro no ato da inoculação. Quanto à severidade final da doença verificou-se os mesmos resultados obtidos por Stromberg et al. (1999).

Diogo e Wydra, (2007) e Dannon e Wydra (2004) estudaram a influência do silício no patossistema: tomateiro vs. *Ralstonia solanacearum* e verificaram atraso no PL da doença nas plantas de tomateiro da cultivar suscetível e da moderadamente resistente nos tratamentos que receberam fertilização silicatada. Resultados semelhantes não foram constatados no presente trabalho.

Observamos também que o PL foi definido como sendo aos quatro DAI e que este não coincidiu com os maiores níveis populacionais demonstrados no estudo da dinâmica populacional (DP) *in planta*. El-Banody e Rudolph (1989) e Duveiller e Maraite, (1995) relataram que os sintomas de anasarca ocorrem devido à multiplicação

da bactéria nos espaços intercelulares e que estes podem se tornar evidentes antes mesmo da Xtu alcançar seus maiores níveis populacionais.

Nos segmentos foliares analisados para a época de coleta 0 DAI, ou seja, imediatamente após a inoculação das plantas, não foi verificado crescimento de nenhuma colônia típica de Xtu. No estudo da DP *in planta* observou-se que nas épocas de coleta que antecederam a necrose das áreas foliares infectadas (8^o DAI para as plantas inoculadas com OD₅₄₀ = 0,05 e no 7^o DAI para as inoculadas com OD₅₄₀ = 0,1), tanto nas plantas supridas com o elemento Si como nas não supridas, houve acentuada diferença nos valores de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido foliar. As plantas de trigo inoculadas com a suspensão mais concentrada da bactéria apresentaram os maiores valores absolutos de UFC g⁻¹ tecido foliar, consequência do maior número de células viáveis introduzidas no interior das folhas no ato da inoculação. Observou-se também que uma vez necrosados, os tecidos infectados apresentaram o mesmo valor de UFC g⁻¹ tecido foliar. Não se obteve diferença significativa na DP da bactéria entre os tratamentos com (Si+) ou sem (Si-), demonstrando que a multiplicação de Xtu se deu de forma plena, sem qualquer resistência por parte do hospedeiro à colonização. Embora Diogo e Wydra (2007) e Dannon e Wydra (2004) não tenham testado diferentes concentrações de inóculo, obtiveram resultados semelhantes quanto a DP da fitobactéria *Ralstonia solanacearum* em genótipo suscetível de tomateiro (L390), fertilizado ou não com silício.

A condutividade elétrica tem sido utilizada para medir a permeabilidade de tecidos vegetais intactos ou que sofreram alterações, induzidas por agentes bióticos ou abióticos, principalmente na integridade de suas paredes celulares, de maneira a permitir o extravasamento do conteúdo celular (Osterhout, 1918 e 1921). Os máximos valores de perda de permeabilidade dos tecidos de trigo infectados pela Xtu, independentemente da concentração de inóculo, coincidiram com os maiores níveis populacionais da bactéria. As folhas sintomáticas, nesta etapa, encontravam-se necrosadas. Valores máximos de perda na permeabilidade dos tecidos foram alcançados quando se inoculou a suspensão bacteriana mais concentrada (OD₅₄₀ = 0,1). Não se observou diferença significativa entre os tratamentos com e sem silício. Quanto a este aspecto, isto mostra que a presença do silício nos tecidos das plantas não interferiu na condutividade elétrica dele, infectado ou não. Cook e Stall (1968) procurando correlacionar a multiplicação de *Xanthomonas vesicatoria* no interior de tecido foliar de pimentão com a perda de permeabilidade (condutividade elétrica; perda ou extravasamento de eletrólitos) destes

tecidos, verificaram que em interações do tipo compatível, os máximos de perda eram alcançados lenta e gradualmente, enquanto que, nas interações do tipo incompatível esta máxima perda de permeabilidade era alcançada rápida e bruscamente. Observaram ainda que, independentemente do tipo de interação, quanto maiores as concentrações do inóculo mais rapidamente e mais elevados eram os valores máximos de perda de permeabilidade. Resultados semelhantes também foram demonstrados por Robinson *et al.* (2006) para o patossistema: alface *vs.* *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

Neste trabalho, foram constatadas diferentes respostas bioquímicas, em plantas supridas ou não com o elemento silício. Com a inoculação do patógeno nas plantas de trigo registrou-se significativas respostas na atividade das enzimas quitinases (QUI), peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PFO). Nas plantas supridas com o elemento silício a atividade máxima ocorreu seis DAI. Após este período, atividades decrescentes foram registradas para todas as enzimas. No 6^o DAI observou-se a presença dos sintomas típicos da estria bacteriana do trigo em 100% das folhas inoculadas com a bactéria. Nas plantas supridas com Si, picos de atividade máxima das enzimas não foram documentados. A atividade das PFO nestas plantas decresceram durante todo o período avaliado. A atividade das três enzimas avaliadas nas plantas supridas com Si, foi sempre menor que aquela registrada nas plantas não supridas com Si, exceto no final das avaliações, entre os 9^o e 12^o DAI para as QUI e para as PPO.

A busca pela potencial ativação de mecanismos de resistência a doenças bacterianas de plantas tem recebido especial atenção nos últimos anos. Chang *et al.* (2002) comprovaram em nível de campo correlação positiva entre doses de silício e controle da mancha bacteriana em cultivares suscetíveis de arroz à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Kagale *et al.* (2004) constataram que a aplicação de extrato foliar de *Datura metel* sobre folhas de plantas de arroz reduziu significativamente a severidade das doenças causadas por o *Rhizoctonia solani* e por *X. oryzae* pv. *oryzae*. A indução da resistência foi constatada, dentre outros, pelo acúmulo de compostos fenólicos e pelo aumento na atividade de enzimas relacionadas à defesa, como as QUI e as POX. Resultados semelhantes foram obtidos por Baysal *et al.* (2003) quando estudaram a resistência induzida pelo acibenzolar-S-methyl ao cancro bacteriano do tomateiro, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Curiosamente os resultados encontrados para a atividade das QUI foram significativos ao longo de todo o período avaliado. As QUI são enzimas que catalisam a hidrólise da quitina, polímero linear insolúvel (poli- β -1,4-N-acetilglucosamina) presente

nas paredes celulares de fungos e do exoesqueleto de artrópodes. Células vegetais e bacterianas não são constituídas por quitina, no entanto, são capazes de sintetizar este grupo de enzimas. No primeiro caso, estudos têm demonstrado que as plantas aumentam a síntese das quitinases em resposta aos danos causados por aqueles fitopatógenos (Kagale *et al.*, 2004; Baysal *et al.* 2003; Stangarlin *et al.*, 2005) e podem ser encontradas nos caules, folhas e sementes das plantas (Boller, 1985, citado por Roberts *et al.*, 1988). De acordo com Roberts *et al.* (1988) quitinases extraídas de sementes de trigo, cevada e milho apresentaram excelentes efeitos inibitórios sobre fungos. No segundo caso, bactérias sintetizam as quitinases para degradarem polímeros complexos como os presentes nos solos e no trato digestivo de animais, e assim obterem moléculas essenciais a sua nutrição.

Considerando os resultados obtidos para a atividade das QUI, três hipóteses poderiam ser levantadas: i) a maior atividade das QUI em plantas de trigo não supridas com Si estariam relacionadas à maior AFC destas? Rodrigues *et al.*, (2004) estudando o patossistema arroz *vs.* *M. grisea* observaram maior área foliar clorótica nas plantas de arroz não supridas com Si àquelas supridas. ii) plantas da cultivar BR18 não supridas com Si estariam sintetizando maiores quantidades destas enzimas na tentativa de conter - atuando diretamente sobre o peptidoglicano das paredes celulares das células bacterianas, constituído por resíduos de β -1,4-N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico - a colonização das folhas pelo patógeno? iii) menores atividades constatadas nas plantas fertilizadas com Si estariam relacionadas à ligação/integração deste elemento a componentes da parede celular (região da lamela média) das células vegetais, impedindo a difusão e a atividade destas enzimas nos espaços intercelulares? Recentemente, Diogo e Wydra (2007) demonstraram, por meio de técnicas histoquímicas, que alterações ocorridas em nível de parede celular e membrana plasmática interferiram negativamente á disseminação da bactéria (*R. solanacearum*) no interior dos vasos condutores, como também, à ação das enzimas pectolíticas - poligalacturonases e metil esterases - produzidas pela bactéria, conseqüentemente, menores incidência e severidade da murcha bacteriana foram constatadas.

Diante dos resultados e argumentos apresentados na tentativa de elucidar aspectos do patossistema: trigo *vs.* *X. translucens* pv. *undulosa*, na presença ou não do Si, conclui-se que as diferenças obtidas na atividade das enzimas avaliadas assim como dos derivados de lignina ácido tioglicólico, representam defesas constitutivas do genótipo hospedeiro potencializadas pela presença do patógeno (Xtu) e não por meio

de mecanismos de resistência que seriam ativados pelo Si. Embora os resultados obtidos confirmem esta suposição, sugere-se que outras condições experimentais sejam testadas, principalmente avaliando genótipos de trigo com diferentes graus de reação ao patógeno e técnicas que permitam avaliações ultraestruturais mais detalhadas.

5. CONCLUSÕES

- Não houve diferença significativa entre os componentes de resistência das plantas de trigo supridas ou não com silício;
- Mecanismos de defesa foram ativados nas plantas de trigo graças a presença da bactéria Xtu;
- O silício não potencializou os mecanismos de defesa;
- Nas condições avaliadas, o silício não controlou a estria bacteriana do trigo;
- MEV não mostrou-se viável às investigações ultraestruturais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacaltchuk, B.; Chaves, M. S.; Lima, M. I. P. M.; Costamilan, L. M.; Maciel, J. L. N. M.; Salvadori, J. R.; Gambatto, A. Características e cuidados com algumas doenças do trigo. Passo Fundo : Embrapa Trigo. 11p. 2006. html. (Embrapa Trigo. Documentos on-line, 64) Disponível em http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do64.htm

Barber, M.S.; Ride, J.P. A quantitative assay for induce lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 32:185-197, 1988.

Baysal, O.; Soyulu, E.M.; Soyulu, S. Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology* 52:747-753, 2003.

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

Bélanger, R. R.; Bowen, P. A.; Ehret, D. L.; Menzies, J.G. Soluble silicon: Its role in crop & disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* 70:329-335, 1995.

Bowen, P.; Menzies, J.; Ehret, D.; Samuels, L.; Glass, A. D. M. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *Journal of the American Society for Horticulture Science* 117:906-912, 1992.

Bragard C., Verdier, V. and Maraite, H. Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grains. *Applied and environmental microbiology* 61:1020-1026, 1995.

Casey, W. H.; Kinrade, S.D.; Knight, C. T. G.; Rains, D. W.; Epstein, E. Aqueous silicate complexes in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell and Environment* 27:51-54, 2003.

Chance, B.; Maehley, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. New York, 2:764-775, 1955.

Chang, S.; Tzeng, D. D.; Li, C. C. Effect of silicon nutrient on bacterial blight resistance of rice (*Oryza sativa* L.). *Second Silicon in Agriculture Conference, Japão*, p.31-33. 2002.

Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41:411-425, 1992.

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

Cook, A. A.; Stall, R. E. Effect of *Xanthomonas vesicatoria* on loss of electrolytes from leaves of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 58:617-619, 1968.

- Dannon, E. A.; Wydra, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:233-243, 2004.
- Datnoff, L. E.; Deren, C. W.; Snyder, G. H. Silicon fertilization for diseases management of rice in Florida. *Crop Protection* 16:525-531, 1997.
- Datnoff, L. E.; Elmer, W. H.; Huber, D. M. Mineral nutrition and plant disease. APS-Press, St. Paul, Minnesota, USA. 278p. 2007.
- Diogo, R. V. C.; Wydra, K. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70:120-129, 2007.
- Duveiller, E.; Fucikovsky, L.; Rudolph, K. The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management. México, DF.:CIMMYT.78p. 1997.
- Duveiller, E.; Maraité, H. Effect of temperature and air humidity on multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and symptom expression in susceptible and field-tolerant wheat genotypes. *Journal of Phytopathology* 143:227-232, 1995.
- El-Banoby, F. E.; Rudolph, K. W. E. Multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *secalis* and pv. *translucens* in host and non-host plants (rye and barley) and development of water soaking. *Bulletin OEPP/EPPO* 19:105-111, 1989.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro. 412 p. 1999.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Disponível em: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_translucens/XANTTR_ds.pdf, Acesso em 03 de maio de 2008.
- Epstein, E. Silicon in plants: facts vs. concepts. pp.1-15. In: *Silicon in Agriculture*, Datnoff, L. E.; Snyder, G. H.; Körndorfer, G. H. (Eds). Elsevier Science, The Netherlands. 2001.
- Epstein, E. Silicon. *Plant Physiology* 50:641-664. 1999.
- Fawe, A.; Abou-Zaid, M.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* 88:396-401, 1998.
- Fawe, A.; Menzies, J. G.; Chérif, M.; Bélanger, R. R. Silicon e disease resistance in dicotyledons. pp. 159-169. In: *Silicon in Agriculture*, Datnoff, L. E.; Snyder, G. H.; Körndorfer, G. H. (Eds.). Elsevier Science, The Netherlands. 2001.
- Fourest, E.; Sands, D. C.; Bjarko, M.; Lund, R. E. Eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from barley seed with dry heat treatments. *Plant Disease* 74:816-818, 1990.

Ibge – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200812comentarios.pdf, 2009. Acesso em 22 de janeiro de 2009.

Ishiguro, K. Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. pp. 277-291. In: *Silicon in Agriculture*, Datnoff, L. E.; Snyder, G. H.; Körndorfer, G. H. (Eds.). Elsevier Science, The Netherlands. 2001.

ISPP - International Society of Plant Pathology. Disponível em: http://www.isppweb.org/names_bacterial_xant.asp. Acesso em: 02 de julho de 2008.

Jones, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23:1349-1360, 1984.

Jones, L. H. P.; Handreck, K. A. Silica in soils, plants and animals. *Advances in Agronomy* 19:107-149, 1967.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-979. 1970.

Kagale, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nadankumar, R.; Samiyappan, R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65:91-100, 2004.

Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57(2):315-319, 1976.

Kim, S. G.; Kim, K. W.; Park, E. W. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves, a cytological mechanism of blast resistance. *Phytopathology* 91:S49. 2001.

Korndörfer, G.H.; Pereira, H.S.; Nolla, A. Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia: GPSi/ICIAG/UFU, 34p. (Boletim Técnico). 2004.

Lanna, A. C.; Oliveira, M. G. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenases pool from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenases. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:87-92, 1996.

Lima, A.L. S.; DaMatta, F. M.; Pinheiro, H. A.; Totola, M. R.; Loureiro, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47:239-247, 2002.

Lins, S. R. O.; Alves, E.; Abreu, M. S. Estudo histopatológico de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:488-495. 2007.

Luz, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:33-78, 1993.

Ma, J.F.; Yamaji, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science* 11:392-397, 2006.

- Malavolta Jr. V. A.; Oliveira, A. R. O. Variabilidade patogênica em isolados de *Xanthomonas translucens*. Summa phytopathologica, 24:108-114, 1998.
- Malavolta Jr., V. A., Beriam, L. O. S., Almeida, I. M. G., Rodrigues Neto, J., Robbs, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. Summa Phytopathologica 34:9-88, suplemento especial. 2008.
- Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego-CA. 674p. 1995.
- Matichenkov, V. V.; Bocharnikova, E. A.; Kosobryukhov, A. A.; Biel, K. Ya. Mobile forms of silicon in plants. Doklady Biological Sciences 418:39-40, 2008.
- Mehta, Y. R. Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* through cereal seed testing. Seed Science and Technology 18:467-476, 1990.
- Mehta, Y. R. Manejo integrado del enfermedades del trigo. Santa Cruz de la Sierra, Bolívia:CIAT. 1993.
- Mehta, Y. R.; Bassoi, M. C. Guazatine plus as a seed treatment bactericide to eradicate *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* from wheat seeds. Seed Science and Technology 21:1-16, 1993.
- Menzies, J. G.; Ehret, D. L.; Glass, A. D. M.; Samuels, A. L. The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. Physiological and Molecular Plant Pathology 39:403-414, 1991.
- Mitani, N.; Ma, J.F. Uptake system of silicon in different plant species. Journal of Experimental Botany, v.56, n.414, p.1255-1261. 2005.
- Mitani, N.; Ma, J.F. Uptake system of silicon in different plant species. Journal of Experimental Botany 56:1255-1261, 2005.
- Miyake, Y.; Takahashi, E. Effects of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. Soil Science and Plant Nutrition 29:463-471, 1983.
- Osterhout, W. J. V. Conductivity and permeability. The Journal of General Physiology 4:1-9, 1921.
- Osterhout, W. J. V. Conductivity as a measure of permeability. The Journal of Biological, Chemistry 36:485-487, 1918.
- Peixoto, P. H. P. Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1998.
- Pereira, S. C. Silício como potencializador da atividade de enzimas de defesa à ferrugem em plantas de café e soja. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.
- Rafi, M. M.; Epstein, E. Silicon absorption by wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant and Soil 211:223-230, 1999.

- Rains, D. W.; Epstein, E.; Zasoski, R. J.; Aslam, M. Active silicon uptake by wheat. *Plant and soil* 280:223-228, 2006.
- Reis, E. M.; Schons, J.; Denardin, N.; Prestes, A. M.; Floss, E. L.; Salvadori, J. R.; Lau, D. Safra 2008: amarelecimento de cereais de inverno preocupou agricultores. *Revista Plantio Direto*, edição 107. 2008. Disponível em http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=884. Acesso em 05 de janeiro de 2009.
- Reis, E. M.; Casa, R. T. Doenças do trigo. pp.631-638. In: *Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas*. Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Eds.). vol. 2, 4ª Edição. p:631-638. 2005.
- Rémus-Borel, W.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:108-115. 2005.
- Roberts, W. K.; Selitrennikoff, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134:169-176, 1988.
- Robinson, P. E.; Jones, J. B.; Pernezny, K. Bacterial leaf spot of lettuce: relationship of temperature to infection and potential host range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis*. *Plant Disease* 90:465-470, 2006.
- Rodrigues, F. Á.; McNally, D. J.; Datnoff, L. E.; Jones, J. B.; Labbé, C.; Benhamou, N.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94:177-183, 2004.
- Rodrigues, F. Á.; Vale, F. X. R.; Korndörfer, G. H.; Prabhu, A. S.; Datnoff, L. E.; Oliveira, A. M. A.; Zambolim, L. Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection* 22:23-29, 2003.
- Rodrigues, F. Á.; Vale, F. X. R.; Korndörfer, G. H.; Seebold, K. W.; Rush, M. C. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease* 85:827-832, 2001.
- Savant, N. K.; Snyder, G. H.; Datnoff, L. E. Silicon management and sustainable rice production. *Advances in Agronomy* 58:151-159, 1997.
- Schaad, N. W. Use and limitations of methods to detect seedborne bacteria. p.115-122. In: *Advanced international course on seed pathology*. Nasser, L. C.; Wetzell, M. M.; Fernandes, J. M. (Eds). ABRATES, Passo Fundo/RS. 336p., 1987.
- Schaad, N. W.; Forster, R. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology* 75:260-263, 1985.
- Schaad, N. W.; Jones, J. B. e Lacy, G. H. *Xanthomonas*. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. (Eds). St. Paul: The American Phytopathological Society, 373 p. 2001.

- Silva, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília:Embrapa (Org.), 370 p. 1999.
- Silva-Lobo, V. L.; Lopes, C. A.; Giordano, L. B. Componentes de resistência à mancha bacteriana e crestamento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. Fitopatologia Brasileira 30:17-20, 2005.
- Sousa, P. G. BR18 – Terena: Cultivar de trigo para o Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37:1039-1043, 2002.
- Stangarlin, J. R.; Pascholati, S. F.; Franzener, G. Phenols, β -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turcicum* in maize genotypes. Summa Phytopathologica 31:261-267, 2005.
- Stromberg, K. D.; Kinkel, L. L.; Leonard, K. J. Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. Biological Control 29:58-65, 2004.
- Stromberg, K. D.; Kinkel, L. L.; Leonard, K. J. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. Phytopathology 89:131-135, 1999.
- Vale, F. X. R., Fernandes-Filho, E. I. F.; Liberato, J. R. QUANT – a software for plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology. 105, 2003.
- Warburg, O.; Christian, W. Isohering und kristallisation des g rungs ferments enolase. Biochemistry Zoology 310:384-421, 1941.
- Wilson, E. E.; Zeitoun, F. M.; Fredrickson, D. L. Bacterial phloem canker, a new disease of persian walnut trees. Phytopathology 57:618-621, 1967.
- Wydra, K.; Boszo, Z.; Diogo, R.; Ghareeb, H.; Huong, N.; Ott, P.; Schacht, T. Does silicon induced resistance affect basal resistance mechanisms of tomato infected with *Ralstonia solanacearum*? Joint International Workshop on: PR-proteins and induced against pathogens and insects. Frana. p.113. (Resumo) 2007.
- Wydra, k.; Semrau, J.; Dannon, E.; Diogo, R. Characterization of the interaction of antagonistic bacteria and of silicon (SiO₂) with tomato infected with *Ralstonia solanacearum*. Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. Alemanha, p.112-118. 2005.
- Yedidia, I; Benhamou, N.; Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Microbiology 1061-1070, 1999.
- Yoshida, S. Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. Bulletin of the National Institute of Agriculture Science 15:1-58, 1965.
- Zieslin, N.; Ben-Zaken, R. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. Plant Physiology Biochemical. 31:333-339. 1993.

