

MICROSCOPIA DE VARREDURA DE OÍDIO EM *Vigna unguiculata* SUPRIDOS COM SILÍCIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Luciana Maria de Lima¹, Eduardo Alves², Marcos André Silva Souza³, José Purcino Neto⁴.

¹UFLA/DFP- Doutoranda, CP 3037-Lavras-MG , lmlimas@yahoo.com.br

²UFLA/DFP- Prof. Microscopia Eletrônica, CP 3037-Lavras-MG, ealves@ufla.br

³UFLA/DCS- Doutorando, CP 3037, s.s.m.andre@uol.com.br

⁴UFLA/DCS- Graduando- Bolsista CNPq, CP3037, netopurcino@bol.com.br

Resumo- Este ensaio teve como objetivo observar por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, a infecção do oídio em folhas de *Vigna unguiculata* tratadas com Si em solução nutritiva. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland contendo 150 mg de Si.L⁻¹ utilizando como fonte silicato de potássio e uma testemunha Si recebendo aeração constante. Os tratamentos consistiram No estágio V2, as plantas foram inoculadas com suspensão de 2x10⁴ conídios mL⁻¹ em dois pares de folhas trifolioladas na face abaxial dos folíolos. Após 21 dias as folhas foram coletadas, cortadas em fragmentos de 2 cm e preparadas para serem observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura. Nas plantas suplementadas com Si (150 mg.L⁻¹), via solução nutritiva, não observou-se presença de hifas na superfície das folhas comparado com a testemunha (sem Si) nas quais foi observado intensa colonização do fungo. Além disso, as plantas supridas com Si apresentaram maior quantidade de amido no interior das células comparado com as plantas que não receberam Si na solução.

Palavras-chave: silicato, feijão, *Erysiphe polygoni*.

Área do Conhecimento: Agronomia

Introdução

O feijão “caupi” (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), tem como origem o continente africano (Rachie & Rawal, 1976). No Brasil, foi inicialmente introduzido nas regiões norte e nordeste cujas condições edafoclimáticas são adequadas ao seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 1984). O caupi constitui-se em uma cultura de subsistência de grande importância para o pequeno agricultor, contribuindo como alimento rico em proteínas.

Um dos principais fatores limitantes do potencial de rendimento do caupi são as doenças. Entre elas o oídio cujo agente etiológico é *Erysiphe polygoni* constitui uma importante doença para esta cultura. Na literatura existem diversos relatos do uso de silício (Si) para controle de oídio em culturas como abóbora, pepino e videira. Embora não seja considerado elemento essencial promove benefícios às culturas, seja por formação de barreira mecânica ou alterações químicas como indução de compostos fenólicos e fitoalexinas promovendo maior resistência ao ataque dos patógenos.

Muitos desses estudos envolvendo Si e doenças de plantas, foram realizados em solução nutritiva (Adatia & Besford, 1986; Menzies *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 2005). Nestas condições é possível isolar o efeito de outros fatores e com isso mostrar de forma mais evidente a contribuição deste elemento na relação Si e intensidade da doença. Assim, o cultivo do feijão “caupi” nestas

condições, utilizando fonte solúvel, como silicato de potássio possibilita o estudo dessa interação. Diante do exposto, esse ensaio teve como objetivo: observar a infecção por oídio em folhas de *Vigna unguiculata* supridas ou não com Si, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Metodologia

Sementes de caupi foram semeadas em bandejas plástica contendo vermiculita. Após a emergência, as plântulas foram transferidas para bandejas com capacidade para 10 litros contendo solução básica de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), a 20% da força iônica.

Após esse período, as mudas foram selecionadas de acordo com a uniformidade de tamanho. Duas plantas foram transplantadas para recipientes plástico com capacidade para 5,5 litros com a solução de Hoagland a 100% da força iônica com o devido tratamento, recebendo aeração constante. Os tratamentos consistiram em 150 mg de Si. L⁻¹ de água utilizando como fonte silicato de silicato de potássio e uma testemunha sem Si. Três vezes por semana, realizou-se o monitoramento do pH da solução nutritiva, mantendo-o entre 5,0 e 5,5 com a adição de HCl 0,1 mol L⁻¹ ou NaOH 0,1 mol L⁻¹. Quando necessário, o volume dos vasos foi completado com água destilada. A troca da solução nutritiva foi

realizada nos diferentes tratamentos, quando a condutividade elétrica atingiu 30% do valor inicial.

Após a transferência das plantas (estádio V2) para solução nutritiva (100% da força iônica), as mesmas foram inoculadas com suspensão de 2×10^4 conídios. mL⁻¹ em dois pares de folhas trifolioladas na face adaxial dos folíolos.

Preparo das amostras para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

O preparo e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Três semanas após a inoculação, coletou-se o terceiro trifólio de cada tratamento. Depois de coletadas, as folhas foram cortadas em discos de 1 cm de diâmetro e imersas em solução fixativa Karnovsky (pH 7,2), por período de 24 horas. Após esse período as amostras foram colocadas em tampão cacodilato e em seguida em seguida, esses fragmentos foram transferidos para uma solução de tetróxido de ósmio (1%) por 1 hora e, subsequentemente desidratadas em série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) por 10 minutos. Na concentração de 100% o processo foi repetido 3 vezes. Após esse procedimento, as amostras foram levadas para o aparelho de secagem ao ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio "stubs" com de fita de carbono colocada sobre película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 (Alves, 2005). Diversas imagens foram geradas e registradas digitalmente, para observar o crescimento micelial e formação de estruturas reprodutivas na superfície das folhas. Para observar o interior das células, realizou-se cortes em nitrogênio líquido. Para isso, o material foi imerso em glicerol (30%) por 30 minutos antes da pós-fixação em tetróxido de ósmio. As demais etapas foram seguidas como descrito acima.

Resultados

Nas plantas não supridas com Si, observou-se intenso crescimento micelial do oídio na superfície das folhas, inclusive com formação de conídios e conidióforos (Figura 1-A). Nas plantas suplementadas com Si (150 mg.L⁻¹), via solução nutritiva, não se observou presença de hifas na superfície das folhas (Figura 1-C). Além disso, observou-se maior quantidade de amido no interior das células comparado com as plantas que não receberam Si na solução como ilustrado nas figuras D e B, respectivamente. Isso pode ser explicado devido ao aumento na taxa metabólica

dos tecidos doentes. Nas plantas infectadas os tecidos doentes utilizam as reservas de carboidratos para suprirem a demanda metabólica e além disso, inicia-se a biossíntese e o acúmulo de diversos compostos incluindo aqueles relacionados aos mecanismos de defesa da planta (Pascholati, 1995).

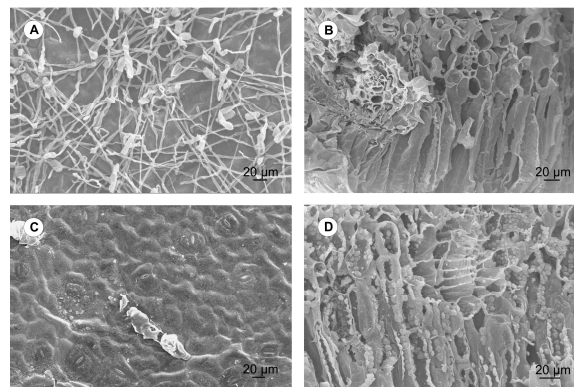


Figura 1- Eletromicrografia de varredura de folhas de feijão caupi sem Si (A e B) e supridas com Si (C e D). Corte em nitrogênio líquido ilustrando menor quantidade de amido (B) e

Discussão

Os mecanismos pelos quais o Si aumenta a resistência das plantas às doenças não são totalmente esclarecidos mas existem diversos trabalhos comprovando as hipóteses de formação de barreira física e química. Pepineiros cultivados em solução nutritiva contendo silicato de sódio e inoculados com o fungo *Podosphaera xanthii* syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht: Fr.) Poll, apresentaram menor número de colônias por folha, menor área da colônia e redução do poder germinativo dos conídios comparado com plantas não supridas com Si (Menzies et al., 1991). Os autores argumentam sobre formação de barreira física uma das causas da menor severidade do oídio.

Folhas de videira infectadas com *Uncinula necator* (Schwein) Burril e pulverizadas com 17 mM de silicato de potássio apresentaram 14% menos colônias quando comparadas com plantas controle. Esses autores, também atribuíram a redução da severidade do oídio da videira, à formação de barreira física, dificultando a penetração das hifas (Bowen et al., 1992).

Por outro lado, plantas fertilizadas com Si podem disparar sistema de defesa na planta ativando enzimas relacionadas à patogênese. Plantas de pepino inoculadas com *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp. e fertilizadas com 1,7 mM de silício na forma de silicato de potássio, em solução nutritiva, apresentam maior atividade

de peroxidases e polifenoloxidasas. Plantas infectadas e com doses altas de Si apresentaram aumento na atividade da β -glicosidase a qual pode associar-se com agliconas fungitóxicas presentes nas raízes de plantas apresentando eficácia na supressão de *Pythium* sp. (Chérif, 1994).

Em outro ensaio Liang et al., (2005) trabalhando com pepino cultivado em solução nutritiva, com metassilicato de potássio, e inoculadas com *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*) observaram maior atividade de peroxidase, polifenoloxidase e quitinase. As plantas inoculadas e tratadas com Si apresentaram maior atividade dessas enzimas, comparadas com plantas supridas com Si e não inoculadas com o patógeno. Peroxidases são enzimas que participam de vários processos, incluindo a biossíntese de lignina. Já as quitinases hidrolisam quitina e podem estar envolvidas na defesa das plantas contra fungos (Guzzo et al., 2004). Os autores relatam que a maior atividade dessas enzimas nas plantas supridas com Si e inoculadas com o patógeno indicam indução de resistência sistêmica, ou seja, respostas de defesa ativadas localmente, podem ser transmitidas para locais distantes do sítio de infecção.

Conclusão

No presente ensaio, a menor infecção do oídio na superfície das folhas de *Vigna unguiculata* pode ser tanto devido à formação de barreira física quanto à ativação de mecanismos bioquímicos de defesa da planta. Em ensaios posteriores serão realizados estudos mais específicos a fim de esclarecer quais mecanismos estão envolvidos.

Referências

- ADATIA, M. H.; BESFORD, R. T. The effects of silicon in cucumber plants grown in recirculation nutrient solution. **Annals Botany**, London, v. 58, n. 3, p. 343-351, 1986.
- ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2005. 43 p. Apostila.
- ARAÚJO, J.P.P. de; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P. das; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P. de; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA FILHO, A. **Cultura de caupi, (*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.): descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1984. 82p. (EMBRAPA-CNPAP. Circular Técnica, 18).
- BOWEN, P.; MENZIES, J. G.; EHRET, D. L. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal American**

Society Horticultural Science, v.117, n. 6, p. 906-912, 1992.

- CHÉRIF, M.; MENZIES, J. G.; BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 371-385, 1994.
- GUZZO, D. S.; HAKAKAVA, R.; TSAI, SIU, MUI. Expressão de genes associados à resistência sistêmica adquirida. In: **REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4.**, 2004, Lavras, 2004. p. 59-69.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: University Of California, 1950. 32 p.
- LIANG, Y. C.; SUN, W. C.; J. SI.; ROMHELD. Effects of foliar-and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant Pathology**, v. 54, n. 5, p. 678-685, 2005.
- MENZIES, J. G.; EHRET, D. L.; GLASS, A. D. M.; HELMER, T.; KOCH, C.; SEYWERD, F. The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*, **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 403-414, 1991.
- PASCHOLATI, S. F & LEITE, B. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: **Manual de Fitopatologia**. v.1. 1995. p. 393-416.
- RACHIE, K.; RAWAL, K.M. **Integrated approaches to improving cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**. Ibadan: IITA, 1976. 36p. (Technical Bulletin, 5).
- SAMUELS, A. L.; GLASS, A. D. M.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 14, n. 5, p. 485-492, 1991.