

OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS DO EFEITO DO SILÍCIO NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE EM TRÊS VARIEDADES DE CAFEIEIRO

Adélia A. A. Pozza¹ E-mail: alana@ufla.br, Edson A. Pozza¹, Eduardo Alves¹, Janice G. de Carvalho¹, Paulo T. G. Guimarães²

¹UFLA - Depto de ciência do solo e de Fitopatologia, Lavras, MG, ²EPAMIG – Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG.

Resumo:

A cercosporiose do cafeeiro é uma das mais importantes doenças na fase de viveiro. Os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito da aplicação de Si (1g de CaSiO₃ incorporado em 1kg do substrato utilizado para encher os tubetes) no controle dessa doença em três variedades de cafeeiro (Catuaí, Mundo Novo e Icatu) e determinar quais os possíveis fatores de resistência associados. As plantas com dois pares de folhas foram inoculadas com suspensão de $1,4 \times 10^4$ conídios de *Cercospora coffeicola* por ml. Aos sete meses após o transplantio, avaliou-se a porcentagem de folhas lesionadas e o número total de lesões por planta. Após essa avaliação, retiraram-se amostras das folhas para o estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de raios X (MAX). As plantas da variedade Catuaí tratadas com silicato tiveram redução de 63,2% nas folhas lesionadas (%) e de 43% no total de lesões por planta, em relação à testemunha. A MAX e o mapeamento para Si indicaram distribuição uniforme do elemento em toda a superfície abaxial das folhas de cafeeiro nas três variedades tratadas. Nas folhas das plantas não tratadas, o Si foi raramente encontrado. Nas imagens de MEV também foi observada camada de cera bem desenvolvida na superfície inferior das folhas originárias de todas as plantas tratadas, sendo esta mais espessa em Catuaí e rara ou ausente nas não tratadas.

Palavras-chave: mancha-de-olho-pardo, *Coffea arabica*, *Cercospora coffeicola*.

MICROSCOPY OBSERVATIONS EFFECTS OF BROWN EYE SPOT CONTROL IN THREE COFFEE CULTIVARS.

Abstract:

Brown eye spot of coffee is an important nursery disease. The goal of this work was to evaluate the effect of silicon (1g of CaSiO₃ incorporated in 1kg of substrate used to filling the containers) on the control of this disease in three coffee cultivars (Catuaí, Mundo Novo and Icatu) and determine which resistance factors were stimulated. Young plants with two pairs of leaves were inoculated with a suspension containing 1.4×10^4 *Cercospora coffeicola* conidia.ml⁻¹. Seven months after inoculation the plants were evaluated to determine the percent of leaves with disease (%) and the total number of lesions per plant. Before the evaluation, leaf samples were studied using a scanning electron microscope and X-ray microanalysis. In the plants of the Catuaí cultivar treated with silicon, there were observed reduction of 63,2% on the leaves with lesions (%) and of 43% on the total lesions per plant, in relationship the not treated plants. X-ray microanalysis and mapping of Si showed uniform distribution of element in the all abaxial surface of leaves of all cultivars treated. On the leaves of not treated plants, the Si was rare or absent. Scanning electron microscopy also showed a very well developed wax layer on the lower leaf surfaces of all cultivars, but this layer was thicker in the Catuaí cultivar and thin or absent in control plants.

Key words: brown eye spot, *Coffea arabica*, *Cercospora coffeicola*.

Introdução

A cercosporiose ou mancha-de-olho-pardo (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) é uma das principais doenças da cultura do café no viveiro. As plantas doentes apresentam desfolha, redução no desenvolvimento e raquitismo, tornando-se impróprias ao plantio (Fernandez-Borrero *et al.*, 1966). O principal método de controle da cercosporiose é o químico. No entanto, uma prática alternativa é manejar a nutrição mineral para aumentar a resistência à doença (Marschner, 1995).

Dentre os nutrientes minerais utilizados no manejo de doenças o Si destaca-se por reduzir a severidade de importantes doenças em várias culturas (Epstein, 1999). O Si pode atuar na constituição de barreira física de maneira a impedir a penetração de fungos e afetar os sinais entre o hospedeiro e o patógeno, resultando na ativação mais rápida e extensiva dos mecanismos de defesa pré e pós-formados da planta (Chérif *et al.*, 1992; Chérif *et al.*, 1994; Epstein, 1999). Como função estrutural, proporciona mudanças anatômicas nos tecidos, como células epidérmicas com a parede celular mais espessa devido à deposição de sílica nas mesmas (Blaich & Grundhöfer, 1998), favorecendo a melhor arquitetura das plantas, além de aumentar a capacidade fotossintética e resistência às doenças (Bélanger & Menzies., 2003).

A microanálise de raios X (MAX) é uma técnica utilizada para avaliar e explicar o efeito do Si na resistência das plantas (Lux *et al.*, 2002). Associada a esta, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) também pode trazer importantes informações sobre a formação de barreiras físicas a penetração e colonização dos patógenos.

Tendo em vista esses fatores, os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência do silicato de cálcio no controle da cercosporiose em mudas de três variedades de café e estudar, por meio da MEV e MAX, os mecanismos de resistência envolvidos.

Material e Métodos

O experimento foi implantado no viveiro de café da Fazenda Experimental da EPAMIG, Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG. Foram avaliadas três variedades de café, Catuaí Vermelho - IAC 99, Mundo Novo - IAC 379/19 e Icatu - IAC 2942. Os tratamentos foram: 1g silicato de cálcio (CaSiO_3)/ dm^3 de substrato e a testemunha, sem silicato. A fonte de Si utilizada foi silicato de cálcio puro para análise (p.a com 64% de SiO). O substrato foi constituído por 80% de esterco bovino curtido e 20% de terra de subsolo. As plântulas foram obtidas em germinador de areia lavada e transplantadas para os tubetes no estádio de "palito de fósforo".

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial de três variedades combinadas com duas adubações (com e sem Si) e quatro repetições. As parcelas foram constituídas por 16 tubetes de 120 cm^3 , considerando-se como parcela útil os seis centrais. Após o transplântio foi realizada adubação com 0,75g de fertilizante de liberação lenta (formulação 15-10-10 de NPK + micronutrientes) por tubete.

Ao atingirem dois pares de folhas definitivas, as mudas de café foram inoculadas com a suspensão de $1,4 \times 10^4$ conídios/ml, segundo metodologia utilizada por Pozza et al. (2001). O número de folhas doentes (%) e o total de lesões de *C. coffeicola* foram avaliados antes da coleta de amostras para observação em MEV, quando as mudas encontravam-se com sete meses de idade.

A preparação e a observação em MEV (DSM940 - Zeiss, acoplado ao sistema de microanálise de raios-X: EDS - OXFORD INSTRUMENT Link ISIS) foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Para tanto, foram retiradas folhas do terceiro par do ramo ortotrópico, contadas partindo do ápice para a base, de cinco mudas de café, dos tratamentos com as doses zero e 1,0 g de CaSiO_3 / dm^3 de substrato, para cada variedade. De cada folha amostrada, foram retirados dois fragmentos do limbo foliar (3 x 3mm cada), os quais foram preparados para observação em MEV. Os dez espécimes obtidos para cada tratamento foram montados em suportes de alumínio "stubs", com o auxílio de fita adesiva de carbono dupla face, sendo cinco com a face inferior do limbo voltada para cima e cinco para baixo. Em seguida foram cobertos com ouro e observados em MEV. Todos os espécimes montados foram observados e quatro imagens da superfície de cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, ao acaso, nas condições de 20 kv e distância de trabalho de 9mm. Destas imagens, foram selecionadas duas de cada variedade, as quais foram preparadas no Software Photopaint® do pacote Corel Draw 9®.

Dez fragmentos, também de 9mm^2 , do limbo foliar, das mesmas folhas utilizadas para a observação em MEV, foram preparados para a microanálise de raios X (MAX). Cortaram-se os dez fragmentos, tendo metade deles sido montados em suportes de alumínio com a face superior voltada para cima e a outra metade com a face inferior voltada para cima. Estes espécimes foram levados para dessecador contendo sílica gel, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foram levados ao aparelho "sputtering" (MED 010, Balzer) e cobertos com uma fina camada de carbono para serem observados em MEV com distância de trabalho 25mm e 20kv. Após análise dos elementos presentes nas amostras procedeu-se o mapeamento para Si na área analisada, utilizando o Software ISIS®. Estas metodologias utilizadas para observação em MAX e em MEV foram desenvolvidas pelo Prof. Eduardo Alves, no Laboratório de Microscopia eletrônica do CENA/ESALQ-USP.

Resultados e Discussão

Foram observadas interações significativas entre as variedades e a presença de Si em relação à intensidade da doença. As plantas da variedade Catuaí com Si incorporado ao substrato apresentaram 63,2% menos folhas lesionadas e 43% menos lesões, quando comparadas à testemunha. Também houve diferença significativa entre as variedades; a Catuaí e a Mundo Novo apresentaram maior número médio de folhas doentes e lesões por planta do que Icatu (Tabela 1). Segundo Matiello & Almeida (1997), a variedade Icatu apresenta maior resistência à cercosporiose. Conforme Marschner (1995), plantas moderadamente resistentes ou suscetíveis à doença respondem melhor à nutrição e conseqüentemente à aplicação de Si. Dessa forma, as respostas da variedade Icatu e da Mundo Novo, em termos de redução de folhas lesionadas e do total de lesões por plantas, foram menores do que a resposta proporcionada pelo Si na variedade Catuaí (Tabela 1). Rodrigues et al. (2001) também encontraram menores respostas à aplicação de CaSiO_3 nas variedades resistentes, para o controle da rizoctoniose de arroz (*Rhizoctonia solani* Khun.).

Tabela 1 - Porcentagem de folhas lesionadas e número total de lesões (*C. coffeicola*) por planta de café das variedades Catuaí, Mundo Novo e Icatu produzidas em tubetes, com e sem incorporação do silicato de cálcio ao substrato de plantio.

Variedade	Folhas lesionadas por planta (%)			Total de lesões por planta		
	Com silic.	Sem silic.	Média	Com silic.	Sem silic.	Média
Catuaí	16,0 a	25,3 b	20,6B	18,8 a	43,3 b	31,1B
M. Novo	22,9 ^{ns}	23,3 ^{ns}	23,1B	24,2 ^{ns}	30,5 ^{ns}	27,4B
Icatu	14,5 ^{ns}	16,0 ^{ns}	15,3A	13,3 ^{ns}	21,8 ^{ns}	9,1A

^{ns} não significativo. Letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

O efeito do Si no controle de doenças em várias culturas foi relatado tanto em mono quanto em dicotiledôneas. Para o cafeeiro, esse efeito ainda não foi bem elucidado. Os mecanismos pelos quais o Si pode conferir resistência à determinada doença podem ser por acúmulo do elemento na parede das células da epiderme e cutícula, acúmulo no local de penetração do patógeno (barreiras estruturais) ou ativação das barreiras químicas e bioquímicas da planta (Epstein, 1999). Por meio de MEV, observou-se a presença de uma cutícula mais espessa na superfície inferior da folha das plantas tratadas com Si, principalmente devido à camada de cera epicuticular mais desenvolvida. Essa camada de cera epicuticular em algumas amostras, principalmente de Catuaí, cobriu parcialmente os estômatos (Figuras 1B, 1D e 1F), enquanto que, nas testemunhas, os estômatos puderam ser observados com clareza (Figuras 1A, 1C e 1E). Embora não tenha sido mensurado nesse experimento, devido ao fato dos estômatos estarem pouco visíveis, ou parcialmente tampados pela camada epicuticular, nas plantas em que o silicato foi incorporado ao substrato, concluiu-se que houve maior espessamento dessa camada, pois os estômatos encontravam-se bem mais visíveis nas plantas não tratadas (Figura 1A, 1C, e 1F). Portanto, dentre as variedades, a Catuaí apresentou camada de cera epicuticular mais espessa (Figura 1B). Essa camada pode ter tornado a superfície hidrofóbica (apolar), impedindo a formação de um filme de água, o que é importante para os processos vitais da patogênese como a germinação e a penetração, além de permitir o acúmulo de substâncias antifúngicas na cutícula. Pascholati & Leite (1995) citaram vários exemplos de patossistemas nos quais a espessura da cutícula teve efeito sobre a penetração de fungos. Portanto, a cutícula mais espessa com a camada de cera epicuticular mais desenvolvida observada neste estudo pode explicar em grande parte a redução no número de lesões de *C. coffeicola* nas variedades Mundo Novo e Catuaí, fato ainda não verificado em outros experimentos com aplicação de Si.

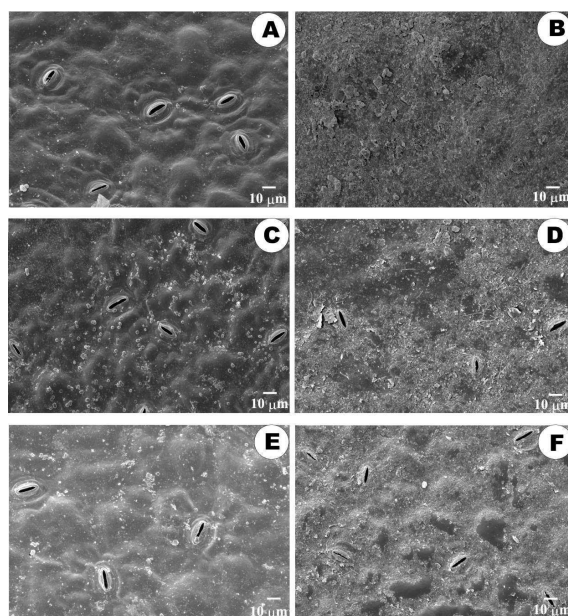


Figura 1 - Superfície inferior de folhas de plantas das variedades Catuaí (A-B), Mundo Novo (C-D) e Icatu (E-F) de cafeeiro, tratadas com CaSiO_3 (B, D e F) e não tratadas (A, C, e E). Foto: Eduardo Alves, 2003.

Pela microanálise de raios X, na face inferior das folhas verificou-se maior quantidade de Si nas folhas de plantas tratadas do que nas não tratadas, estando o Si ausente nestas últimas. Quando se procedeu ao mapeamento para Si, verificou-se distribuição uniforme do Si na superfície da área analisada das folhas tratadas. Na testemunha, o Si foi encontrado de forma localizada, possivelmente por contaminação do material (Figura 2).

A polimerização de Si na superfície inferior da folha, processo denominado silicificação, é comum em gramíneas (Lux et al., 2002) e pode ocorrer em dicotiledôneas (Epstein, 1999), porém, até então, não havia sido verificado em cafeeiro. Foi observado, por meio da MAX, que o Si encontrava-se posicionado principalmente na epiderme, pois, quando as áreas com pouca cera epicuticular foram analisadas, o teor do elemento foi detectado em menor quantidade. Em corte transversal da folha, a quantidade de Si detectada foi mínima e praticamente igual à da testemunha. Em áreas da superfície inferior da folha de onde a cutícula foi retirada, ainda verificou-se a presença de Si quando se procedeu ao mapeamento (dados não apresentados). A presença deste elemento na camada externa da epiderme foi observada por Carver et al. (1987). Uma característica própria do Si(OH)_4 é a facilidade que parte do Si^{+4} tem de sair do estado de coordenação quatro (tetraédrica) e assumir uma coordenação seis (octaédrica). O composto hexacoordenado $[(\text{H}_2\text{O})\text{Si(OH)}_5]^-$ é o ponto de partida para a polimerização. A polimerização, que precede a precipitação, é causada pela combinação de unidades de $[(\text{H}_2\text{O})\text{Si(OH)}_5]^-$. Haverá precipitação quando polímeros de $[(\text{H}_2\text{O})\text{Si(OH)}_5]^-$ combinarem-se com monômeros (solúveis) de Si(OH)_4 (McKeague & Cline, 1963 a e b; Iler, 1979). Esses autores também observaram que a complexação do silício com

compostos fenólicos na parede das células da epiderme pode reduzir e dificultar a expansão das lesões, bem como a intensidade de doença, por tornar as células mais rígidas, fato verificado mais recentemente por Rodrigues et al. (2001).

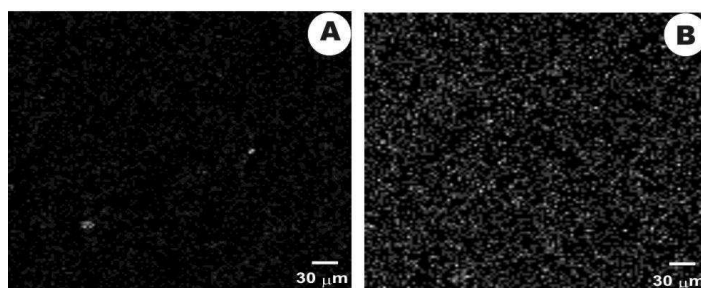


Figura 2 - Mapeamento para Si da área do limbo foliar de folhas de mudas de cafeeiro, variedade Catuaí, mostrando uma menor presença e distribuição mais concentrada do elemento em folha de planta não tratada (A) e maior presença e distribuição mais uniforme em folha de planta tratada com CaSiO_3 (B). Foto: Eduardo Alves, 2003.

Considerando a facilidade de formação do complexo octaédrico $[(\text{H}_2\text{O})\text{Si}(\text{OH})_5]$ parece razoável admitir a substituição de parte dos grupamento (OH) por fenóis nas moléculas do complexo ou a própria combinação intermolecular da espécie $[(\text{H}_2\text{O})\text{Si}(\text{OH})_5]$ com os compostos fenólicos (Prof. Ruy Carvalho DQI/UFLA – comunicação pessoal). Essas constatações podem afetar a epidemiologia da doença, tanto por reduzir a penetração quanto por contribuir para menor esporulação do fungo.

Além do Si, as amostras tratadas apresentaram maior quantidade de Fe e a presença de Zn e Cu, a qual não foi verificada nas testemunhas (Figuras 3A-4F). Além da ação antifúngica (Marschner, 1995), esses micronutrientes podem atuar como co-fatores na síntese de enzimas, inclusive naquelas ligadas à patogênese, tornando-se mais uma evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa da planta. O maior acúmulo desses micronutrientes, nas folhas pode estar associado com a indução da resistência sistêmica (Bélanger & Menzies, 2003) e contribuir para a melhor nutrição das mudas. Essa resistência foi observada em arroz e em pepino devido à produção de fitoalexinas e compostos fenólicos em plantas tratadas com Si (Fawe *et al.*, 1998; Seebold *et al.*, 2000). Outro efeito do Si é o da ativação das defesas químicas e bioquímicas da planta, aumentando o conteúdo de fenóis e a atividade das enzimas quinase, peroxidase, glicosidase, fenilamoniase e polifenoloxidase (Fawe *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2001; Bélanger & Menzies, 2003), as quais não foram analisadas neste estudo. Essas análises, em trabalhos futuros, poderiam contribuir para explicar a redução do número de lesões ocorrida nas variedades Catuaí e Mundo Novo.

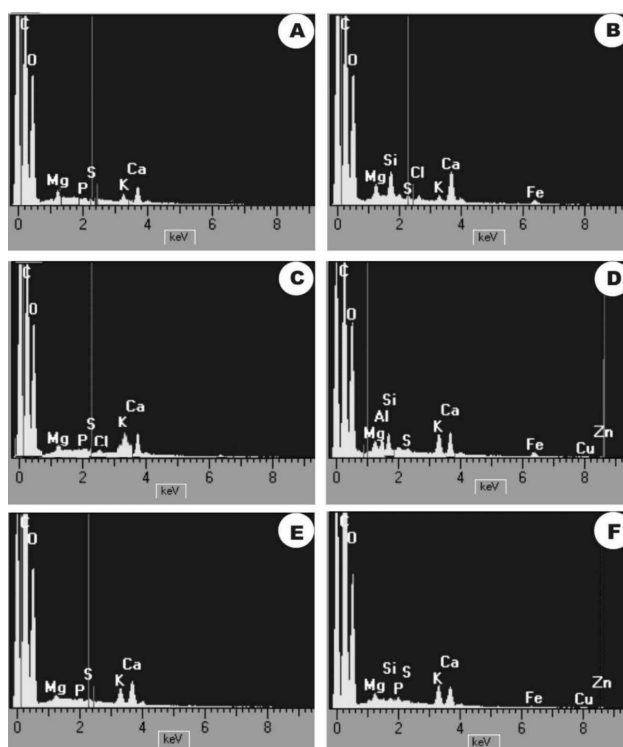


Figura 3 - Microanálise de raios X da superfície inferior de folhas das variedades de cafeeiro (A-F) Catuaí (A-B), Mundo Novo (C-D) e Icatu (E-F). Microanálise de folhas de planta não tratadas (A, C e E) e de folhas de plantas tratadas (B, D e F) com CaSiO_3 . Foto: Eduardo Alves, 2003.

Conclusões

O Si promoveu a formação de barreira física e química em mudas de cafeeiro, principalmente na variedade Catuaí. A barreira física foi formada pela camada de cera inibindo fisicamente a penetração da *C. coffeicola* e a química foi dada pelo maior acúmulo de micronutrientes na parte aérea, aumentando a defesa imunológica das mudas.

Referências Bibliográficas

Bélanger, R. R.; Menzies, J. G. Use of silicon to control diseases in vegetable crops. **Revista de Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 42-45, ago. 2003. Suplemento.

Blaich, R.; Grundhöfer, H. Silicate incrusts induced by powdery mildew in cell walls of different plant species. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 105, n. 2, p. 114-120, Mar. 1998.

Carver, T. L. W.; Zeyen, R. J.; Ahlstrand, G. G. The relationship between insoluble silicon and success or failure of attempted primary penetration by powdery mildew (*Erysiphe graminis*) germinating on barley. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 31, n. 1, p. 133-148, July 1987.

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

Chérif, M.; Benhamou, N.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 6, p. 411-425, June 1992.

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

Fernandez-Borrero, O.; Mestre, A. M.; Duque, S. I. L. Efecto de la fertilizacion en la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) en frutos de café. **Cenicafé**, Chinchina, v. 17, n. 1, p. 5-17, ene./mar. 1966.

Fawe, A.; Abou-Zaid, M.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 396-401, May 1998.

Iler, R. K. **The chemistry of silica**. New York: John Wiley, 1979. 400 p.

Lux, A.; LUxova, M.; Hattori, T.; Inanaga, S.; Sugimoto, Y. Silicification in sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars with different drought tolerance. **Physiologic Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 87-92, May 2002.

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

Matiello, J. B.; Almeida, S. R. **Variedades de café** – como escolher, como plantar. Rio de Janeiro: MAA/SDR/PROCAFÉ, 1997.

McKeague, J. A.; Cline, M. G. Silica in soils solutions. **Advances in Agronomy**, New York, v. 15, n. 1, p. 339-396, 1963a

McKeague, J. A.; Cline, M. G. Silica in soils solutions. I The form and concentration of dissolved silica in aqueous extracts of some soils. **Canadian Journal Soil Science**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 70-82, Mar. 1963b.

Pascholati, S. F.; Leite, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H, AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia** – princípios e conceitos. São Paulo: Ceres. 1995. p. 417-453.

Pozza, A. A. A.; Martinez, H.E.P.; Caixeta, S.L.; Cardoso, A.A.; Zambolim, L.; Pozza, E.A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **PAB - Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.1, p.53-60, 2001.

Rodrigues, F.; Datnoff, L. E.; Korndörfer, G. H.; Seebold, K. W.; RUSH, M. C. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 8, p. 827-832, Aug. 2001.

Seebold, K. W.; Datnoff, L. E.; Correa-Victoria, F. J.; Kucharek, T. A.; Snyder, G. H. Effect of silicon rate host resistance on blast, scald, and yield of upland rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 8, p. 871-876, Aug. 2000.