

ANTONIA MIRIAN NOGUEIRA DE MOURA GUERRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA
DO ALGODOEIRO À RAMULOSE MEDIADA PELO SILÍCIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

ANTONIA MIRIAN NOGUEIRA DE MOURA GUERRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA
DO ALGODOEIRO À RAMULOSE MEDIADA PELO SILÍCIO**

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

APROVADA: 24 de novembro de 2011.

Leonardo Ângelo de Aquino

Trazilbo José de Paula Júnior

Fabício de Ávila Rodrigues
(Co-orientador)

Fábio Murilo DaMatta
(Co-orientador)

Paulo Geraldo Berger
(Orientador)

À minha família,

Dedico

*“Dar um passo na direção desejada já é
chegar.”*

(Pe. Fábio de Melo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro (Processo CAG-APQ-01072-10).

Ao Departamento de Fitopatologia, pelo apoio na execução dos experimentos.

Ao Prof. Paulo Geraldo Berger, pela orientação, amizade e confiança.

Em especial, ao Prof. Fabrício Ávila Rodrigues, pela amizade, paciência, confiança e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Fábio Murilo DaMatta, pela co-orientação.

Ao pesquisador Trazilbo José de Paula Júnior e ao Prof. Leonardo Ângelo de Aquino, pela participação na banca examinadora.

À Embrapa Algodão, na pessoa do pesquisador Dr. Nelson Dias Suassuna, pelo fornecimento dos isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Bruno pela sua disponibilidade.

Aos estudantes de graduação Yasmim, Angélica, Rafael, Cristiane, Isaías e Cecília, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Interação Planta-Patógeno, pelo apoio e auxílio.

Às amigas Gisele e Renata, pela amizade e auxílio durante os experimentos.

Aos amigos Trícia, Romenique e Prof^a. Auxiliadora Santos, pela amizade, confiança, carinho e pelas palavras encorajadoras nas horas mais difíceis.

Ao meu esposo e amigo Raniele, por me ensinar que amar é dedicação e entrega. Pela presença em todos os momentos, pela paciência, amor e incentivo.

Aos meus pais Ozana e Naldo, pela educação, incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

À minha irmã Joana, pelo carinho e apoio em todos os momentos de dificuldades.

Enfim, a todos, que contribuíram, direta ou indiretamente, para que essa etapa de minha vida pudesse se concretizar.

BIOGRAFIA

ANTONIA MIRIAN NOGUEIRA DE MOURA GUERRA, filha de Francinaldo Paulo de Moura e Ozana de Freitas Nogueira de Moura, nasceu em 11 de janeiro de 1985, em Campo Grande, RN.

Em março de 2003 ingressou no curso de agronomia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em Mossoró, RN, graduando-se em janeiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em outubro de 2008, foi admitida no Doutorado Direto em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua tese em novembro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. A importância da cultura do algodoeiro.....	1
2. A ramulose do algodoeiro	2
2.1 Sintomas	2
2.2 Condições climáticas favoráveis à ramulose.....	3
2.3 Manejo da ramulose	4
3. Doenças e alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas.....	5
4. O silício.....	6
4.1 Silício e os processos fisiológicos das plantas	8
5. Referências.....	9
CAPÍTULO 1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO À RAMULOSE POTENCIALIZADA PELO SILÍCIO	14
1. Introdução	15
2. Material e Métodos	16
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro	16
2.2 Obtenção do inóculo de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e inoculação das plantas	17
2.3 Avaliação do período de incubação (PI), incidência e severidade da ramulose	17
2.4 Determinação da concentração foliar de Si.....	18
2.5 Determinação da atividade de enzimas de defesa	18
2.5.1 Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	18
2.5.2 Atividade da polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1)	19
2.5.3 Atividade de quitinases (QUI, EC 3.2.1.14).....	19
2.5.4 Atividade de β -1,3-glicanases (GLI, EC 3.2.1.6)	20
2.5.5 Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5).....	20
2.6 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST)	21
2.7 Determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG).....	22
2.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	22
3. Resultados	23
3.1 PI, incidência, severidade da ramulose e concentração foliar de Si.....	23
3.2 Correlação de Pearson.....	23
3.3 Atividades de POX e PPO.....	23
3.4 Atividades de QUI e GLI	24
3.5 Atividade da FAL.....	24
3.6 Concentrações de CFST e DLATG.....	24
4. Discussão	25
5. Referências.....	28
CAPÍTULO 2. CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS DE ALGODOEIRO INFECTADAS POR COLLETOTRICHUM GOSSYPHII VAR. CHEPHALOSPORIOIDES E SUPRIDAS COM SILÍCIO	40
1. Introdução	41
2. Material e Métodos	43
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro	43

2.2 Obtenção do inóculo de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e inoculação das plantas	43
2.3 Avaliação da severidade.....	44
2.4 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas.....	44
2.5 Determinação da concentração de pigmentos	45
2.6 Massa seca e razões alométricas	45
2.7 Determinação da concentração foliar de Si.....	46
2.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	46
3. Resultados	47
3.1 Índice da ramulose e concentração foliar de Si.....	47
3.2 Trocas gasosas.....	47
3.3 Concentração de pigmentos	48
3.4 Razões alométricas.....	49
3.5 Correlação de Pearson.....	49
4. Discussão	49
5. Referências.....	53
CAPÍTULO 3. METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE ALGODOEIRO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR COLLETOTRICHUM GOSSYPII VAR. CEPHALOSPORIOIDES	71
1. Introdução	72
2. Material e Métodos	73
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro	73
2.2 Obtenção do inóculo de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e inoculação das plantas	74
2.3 Avaliação da severidade.....	75
2.4 Determinação da concentração foliar de Si.....	75
2.5 Coleta de amostras para determinação da atividade enzimática	75
2.6 Determinação da atividade das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo.....	76
2.6.1 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)	76
2.6.2 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	76
2.6.3 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	77
2.6.4 Determinação da atividade da redutase da glutationa (GR, EC 1.8.1.7)	77
2.7 Determinação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	77
2.8 Determinação do aldeído malônico (MDA).....	78
2.9 Determinação da atividade de lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12)	78
2.10 Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	79
3. Resultados	79
3.1 Índice da ramulose e concentração foliar de Si.....	79
3.2 Atividades das enzimas do metabolismo anti-oxidativo	79
4. Discussão	81
5. Referências.....	84
CONCLUSÕES.....	96

RESUMO

GUERRA, Antonia Mirian Nogueira de Moura, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da resistência do algodoeiro à ramulose mediada pelo silício.** Orientador: Paulo Geraldo Berger. Coorientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Fábio Murilo DaMatta.

Um dos papéis mais importantes do silício (Si) é o aumento da resistência das plantas ao ataque por patógenos. No entanto, apesar de muitos estudos demonstrarem um papel ativo desse elemento na resistência das plantas às doenças, nada se conhece sobre os múltiplos mecanismos de defesa modulados por esse elemento no patossistema algodoeiro-*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do Si em reduzir os sintomas da ramulose, bem como investigar os aspectos fisiológicos e bioquímicos da resistência mediada por esse elemento. Além disso, investigar como o Si afeta a capacidade fotossintética e o metabolismo antioxidativo do algodoeiro. Plantas de algodão das cultivares BRS Araçá e Fiber Max 993 (FM 993) foram cultivadas em vasos com solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício. A aplicação de Si reduziu o índice da ramulose do algodoeiro. O aumento na concentração de compostos fenólicos e de derivados da lignina-ácido tioglicólico nas plantas das duas cultivares supridas com Si, e a maior atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), quitinase (QUI), glucanases (GLU) nas plantas da BRS Araçá, e das enzimas POX e fenilalanina amônia-liase (FAL) nas plantas da FM 993, potencializaram os mecanismos químicos de defesa ao patógeno, conforme é relatado pela literatura. A infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* alterou a capacidade fotossintética das plantas de algodoeiro das duas cultivares avaliadas. O fornecimento de Si às plantas de algodoeiro incrementou a matéria seca total das plantas de algodoeiro, devido a aumentos na taxa de assimilação líquida de carbono, maior condutância estomática e fixação de CO₂. A maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas plantas das duas cultivares supridas com Si, aumentou a atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), o que reduziu as concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de aldeído malônico (MDA), o que reduziu a peroxidação lipídica. Os resultados suportam a hipótese que o fornecimento de Si pode interagir com muitos componentes do sistema fisiológico das plantas de algodoeiro, potencializando a resistência à ramulose.

ABSTRACT

GUERRA, Antonia Mirian Nogueira de Moura, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2011. **Physiological and biochemical aspects of cotton resistance to ramulosis mediated by silicon.** Adviser: Paulo Geraldo Berger. Co-Advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues and Fábio Murilo DaMatta.

One of the most important roles of silicon (Si) is the increased resistance of plants to attack by pathogens. However, despite many studies showing an active role of this element in plant resistance to diseases, nothing is known about the multiple defense mechanisms modulated by this element in the pathosystem cotton-*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of Si in reducing symptoms of ramulosis as well as investigate the physiological and biochemical aspects of resistance mediated by this element. In addition, to investigate how Si affects the photosynthetic capacity and antioxidant metabolism in cotton. Cotton plants of BRS Araçá and Fiber Max 993 (FM 993) were grown in pots with nutrient solution containing (+Si) or not (-Si) silicon. The application of Si reduced the rate ramulosis. The increase in the concentration of phenolic compounds and derivatives of lignin-thioglycolic acid in plants of two cultivars supplied with Si, and the increased activity of defense enzymes peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), chitinase (CHI), glucanases (GLU) in plants of BRS Araçá and POX enzymes and phenylalanine ammonia-lyase (FAL) in plants of FM 993, potentiated the chemical mechanisms of defense to the pathogen, as reported in the literature. Infection with *C. gossypii* var. *cephalosporioides* changed the photosynthetic capacity of cotton plants of two cultivars. The supply of Si on cotton plants increased the total dry matter of cotton plants, due to increases in the rate of net carbon assimilation, stomatal conductance and higher CO₂ fixation. The increased activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) in plants of two cultivars supplied with Si increased the activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), which reduced the concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malonic aldehyde (MDA), which reduced the lipid peroxidation. The results support the hypothesis that the supply of Si can interact with many components of the physiological system of cotton plants, increasing the ramulosis resistance.

INTRODUÇÃO GERAL

1. A importância da cultura do algodoeiro

A cultura do algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch) é uma das maiores riquezas do setor agrícola mundial, exerce grande importância econômica e social. Dentre as fibras têxteis, naturais ou artificiais, o algodão é a mais importante pela multiplicidade e qualidade de aplicação (Freire, 2011).

No Brasil, o algodão tem grande importância na geração de emprego e, segundo CONAB (2011), encontra-se presente na maioria de seus Estados, com mais de 1,4 milhão de hectares plantados na safra 2010/2011, com produção de 1,96 milhão de toneladas e produtividade média de 3700 kg/ha de algodão em caroço CONAB (2011). A cadeia produtiva do algodoeiro são geradas riquezas superiores a US\$25 bilhões de dólares anualmente, representando cerca de 4% do PIB nacional e mais de 13,5% do PIB industrial. Mundialmente, o algodão é responsável por mais de 40% da vestidura da humanidade, e no Brasil representa mais de 60% dos insumos têxteis (Freire, 2011).

A partir da década de 90, o Cerrado brasileiro despontou para a cotonicultura, ocupando atualmente, o ranking de maior produtor brasileiro de algodão, sendo responsável por mais de 80% da área nacional cultivada (Freire, 2011).

As doenças do algodoeiro no Brasil vinham sendo subestimadas devido à, pelo menos, duas razões: de um lado, níveis inéditos de tecnificação e preços favoráveis do produto permitiam altas produtividades físicas e econômicas a despeito dos gastos com o controle químico dos patógenos; de outro, doenças altamente destrutivas, como a murcha de Fusário e nematóides não ocorriam nas novas e principais regiões de cultivo, como Mato Grosso e Bahia, como vem acontecendo nesses últimos anos (Suassuna & Coutinho, 2011).

As cultivares de algodoeiro adaptadas às condições edafoclimáticas do Cerrado brasileiro, com elevado rendimento de fibra, levaram à grande expansão da cultura nos últimos anos, porém a ausência de resistência tem lavado ao aumento da pressão de inóculo nessas áreas, e doenças que apresentavam importância secundária, por se manifestarem no final do ciclo, passaram a ser mais frequentes e a ocasionar maiores perdas na produção (Suassuna & Coutinho, 2011).

2. A ramulose do algodoeiro

A ramulose foi observada pela primeira vez no município de Racharia, São Paulo, em 1936 por Costa & Fraga Jr. (1937). Pensou-se, no início, tratar-se de uma doença causada por vírus (Cia, 1997). Em 1939, os mesmos autores determinaram o agente causal desta doença como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e foi confirmado que somente este patógeno, e não *Colletotrichum gossypii*, causava a ramulose em algodoeiro (Costa & Fraga Jr., 1939). Atualmente, a ramulose encontra-se distribuída em quase todos os Estados do Brasil onde se cultiva algodão (Suassuna & Coutinho, 2011).

Além do Brasil, sua ocorrência também foi relatada na Venezuela, Bolívia (Malaguti, 1955) e Paraguai (Mathieson & Mangano, 1985). Na Venezuela e em alguns países de língua inglesa, a doença é conhecida por “witches broom” devido à semelhança dos sintomas morfológicos externos com a vassoura-de-bruxa do cacaueteiro e pela aparência de vassoura, induzida às plantas infectadas pela emissão de ramificações excessivas (Araújo, 2000).

No Brasil, a ramulose sempre esteve relacionada a grandes perdas, principalmente na região Centro-Oeste, incluindo o estado de Mato Grosso. Alguns autores relatam prejuízos severos ocasionados pela ramulose da ordem de 20 a 30%, chegando a 85% em casos extremos (Suassuna & Coutinho, 2011).

2.1 Sintomas

As quatro características principais dos sintomas nas plantas infectadas são manchas nas folhas, queima do ápice, redução do porte e superbrotamento (Saran, 2009). Os sintomas se caracterizam inicialmente pelo aparecimento de lesões necróticas em plantas de qualquer idade, preferencialmente em tecidos jovens da haste principal e/ou secundária, na forma de lesões necróticas nos bordos, limbo foliar e nervuras superbrotamento (Suassuna, 2005). O tecido necrosado se rompe, originando perfurações nas folhas, e o crescimento desigual do tecido provoca o enrugamento do limbo foliar (Suassuna & Coutinho, 2011). Logo após o surgimento das primeiras lesões nas folhas, ocorre a morte do meristema apical do ramo atacado. Há paralisação do crescimento do ramo e estímulo a brotação de gemas laterais. Isso confere à planta um aspecto envassourado, com ramos apresentando entrenós curtos e contorcidos, o que reduz o porte da planta (Suassuna, 2005).

Plantas infectadas antes do florescimento abortam estruturas florais devido à competição por seiva pelos demais ramos vegetativos. A ramulose tardia (de ocorrência a partir da fase de florescimento) pode provocar superbrotamento, porém com pouca ou nenhuma redução na produtividade (Juliatti & Ruano, 1997). A inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas com 25 e 35 dias após a emergência provoca maior severidade que em plantas mais velhas, entretanto a percentagem de infecção nas sementes e a transmissão da doença da semente para a plântula é baixa (Santos et al., 1993). O período fenológico mais favorável para a infecção das sementes e transmissão do patógeno semente-plântula é quando a maçã já está desenvolvida (Santos et al., 1993).

2.2 Condições climáticas favoráveis à ramulose

A ramulose é favorecida por condições climáticas como chuvas intensas, temperatura na faixa de 25 a 30 °C e alta umidade relativa do ar, acima de 80% (Saran, 2009). O maior aumento da incidência da ramulose em condições de campo foi verificado aos 81 dias após a emergência, quando a umidade relativa e as temperaturas mínimas atingiram valores máximos de 90% e 18 °C, respectivamente. A paralisação da doença coincidiu com a escassez das chuvas e a redução da temperatura para 12,8 °C, demonstrando que tais variáveis climáticas são importantes no desenvolvimento da ramulose (Suassuna, 2005).

Há evidências de que a população do patógeno no Brasil seja clonal, possivelmente devido ao intenso fluxo de sementes infectadas. Essa é a principal maneira de dispersão do fungo em longas distâncias. Foi verificado ainda que a doença atingiu uma distância de 9 m da fonte de inóculo após 46 dias de emergência e é mais severa em condições de umidade e temperaturas altas e dias nublados (Suassuna, 2005).

A principal via de transmissão do patógeno é pela semente, responsável pela introdução da doença em áreas indenadas. O fungo tanto pode ser transportado na superfície externa das sementes como no interior da amêndoa, dependendo da resistência do genótipo. O patógeno pode sobreviver por até 12 meses na semente armazenada com umidade em torno de 12 a 13% e temperatura variando de 16,6 a 33 °C. A percentagem de sementes infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* está relacionada ao estágio de desenvolvimento do algodoeiro e com as condições de precipitação pluviométrica e de umidade relativa do ar prevalentes durante a

formação e desenvolvimento das maçãs (Lima et al., 1985). Aparentemente, não há relação entre o índice de severidade de doença no campo e transporte de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pela semente (Nascimento Jr. et al., 1997). É possível que genótipos suscetíveis, com índice relativamente elevado de doença no campo, possam produzir sementes cujo nível de incidência do patógeno não seja proporcional à severidade de sintomas na planta. Da mesma forma, sementes de genótipos resistentes podem transportar o patógeno em taxas que não se correlacionam com o grau de resistência da planta (Tanaka & Menten, 1992).

2.3 Manejo da ramulose

O manejo da ramulose envolve práticas culturais, principalmente a rotação de culturas, uso de cultivares com algum nível de resistência, tratamento químico de sementes e aplicações de fungicidas na parte aérea das plantas. O cultivo contínuo de algodão e o uso de sementes contaminadas contribuem para o acúmulo de inóculo na área que, associado a períodos prolongados de chuva, culminam em danos econômicos (Suassuna & Coutinho, 2011).

Não existe imunidade à ramulose nas cultivares de algodoeiro em uso. No entanto, a cultivar IAC 24 possui bom nível de resistência. As cultivares BRS Aroeira, BRS Araçá, BRS Camaçari e BRS 269 Buriti são moderadamente resistentes (Morello et al., 2006). A cultivar HR 102 é altamente resistente à ramulose, porém, por não possuir características agronômicas desejáveis, não é cultivada em escala comercial (Suassuna & Coutinho, 2011).

Em áreas onde não se faz rotação de culturas, é comum o uso de fungicidas em várias aplicações, para o controle químico da ramulose. O uso de fungicida para tal fim deve ser iniciado quando os primeiros sintomas (lesões necróticas em forma de estrela nas folhas mais novas) forem identificados em poucas plantas (1 a 2%) no campo (Suassuna & Coutinho, 2011). O controle químico só é eficaz quando feito no início do surgimento dos primeiros sintomas (Suassuna & Coutinho, 2011). Alguns fungicidas, destacando-se os grupos químicos dos inorgânicos, cloroaromáticos, benzimidazóis, dicarboximidas e triazóis são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, tanto para o controle químico da doença na parte aérea quanto para o tratamento de sementes (Suassuna & Coutinho, 2011).

3. Doenças e alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas

Do ponto de vista fisiológico, um dos principais danos causados pelos patógenos que atacam a aérea foliar é sobre os processos fotossintéticos (Berger et al., 2007). Características fotossintéticas tais como as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila a têm sido consideradas como indicadores úteis do comportamento da atividade do aparelho fotossintético em plantas sob condições de estresse, incluindo o causado por patógenos (Berger et al., 2007; Lichtenthaler & Miehe 1997). Vários estudos têm demonstrado que a infecção por patógenos leva a uma diminuição da fotossíntese (Bastiaans, 1993; Berger et al., 2007) e modificações no aparelho fotossintético (Lichtenthaler & Miehe 1997).

Plantas expostas a estresses bióticos e/ou abióticos normalmente produzem em maior extensão espécies reativas de oxigênio (EROs) incluindo o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio singleto (1O_2) (Apel & Hirt, 2004). Caso não sejam rapidamente eliminados do metabolismo, os radicais livres podem reagir com os ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, nas membranas das organelas e endomembranas, causando a peroxidação dos lipídeos (Scandalios, 1993). Além disso, as EROs podem danificar os pigmentos fotossintéticos, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos (Moller, 2001).

As enzimas antioxidantes mais importantes envolvidas na detoxificação de EROs são as dismutases do superóxido (SOD), que catalizam a dismutação do O_2^- a H_2O_2 ; as catalases (CAT), que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Svalheim & Robertsen, 1993), e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa como as peroxidases do ascorbato (APXs), que reduzem o H_2O_2 utilizando o ascorbato como doador de elétrons (Yan et al., 1996). O ascorbato oxidado é, então, reduzido pela glutatona reduzida (GSH) oriunda da glutatona oxidada (GSSG), catalizada pela redutase da glutatona (GR) às expensas da NADPH (Yan et al., 1996).

Diversos estudos têm comprovado que as enzimas relacionadas com a defesa e antioxidantes, como a peroxidase (POD) (Campos-Vargas & Saltveit, 2002), a SOD e a CAT (Svalheim & Robertsen, 1993), podem desempenhar papéis importantes nas respostas de defesa das plantas quando infectadas por patógenos. As EROs são consideradas tóxicas aos patógenos. Assim, as enzimas relacionadas com a detoxificação das EROS desempenham papel fundamental na modulação do nível delas na planta como respostas de defesa (Delledonne et al., 2001). De acordo com

Paranidharan et al. (2003) e Zhang et al. (2006), a POD, a SOD e a CAT estão envolvidas na resposta de defesa do arroz à infecção por *R. solani*.

4. O silício

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, 27%, em massa, sendo superado apenas pelo oxigênio (Epstein, 1999). Mesmo não sendo considerado essencial às plantas, a pesquisa tem demonstrado que o Si está envolvido em vários aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos destas (Marschner, 1995).

Este elemento traz consigo alguns benefícios às plantas, dentre eles pode-se citar o controle das doenças de plantas.

Estão registrados na literatura que o Si aumenta a resistência de várias espécies de plantas à pragas, doenças e a estresses de caráter abiótico (por exemplo: altas temperaturas, déficit hídrico no solo e toxidez por metais pesados) (Marschner, 1995; Chérif et al., 1992, 1994; Menzies et al., 1992; Mitani & Ma, 2005).

Algumas plantas são beneficiadas pelo Si, principalmente aquelas pertencentes às famílias Poaceae, Equisetaceae e Cyperaceae (Epstein, 1999). As dicotiledôneas acumulam menos de 1% de Si; os cereais de inverno (como o trigo, a aveia, o centeio e a cevada) e a cana de açúcar chegam a acumular mais de 1%, e as gramíneas de ambiente aquático, como o arroz, acumulam acima de 5% de Si na matéria seca (Epstein, 1999).

Diversos trabalhos apresentam o Si como fator que exerce influência sobre o grau de suscetibilidade de gramíneas e algumas dicotiledôneas ao ataque por fungos.

Em monocotiledôneas, há algum tempo já é conhecido os efeitos associados ao fornecimento de Si e o controle de doenças fúngicas. Porém, esse efeito não se restringe apenas as monocotiledôneas, em dicotiledôneas também já existem registros dos efeitos benéficos do Si sobre controle de doenças fúngicas (Chérif et al., 1992, 1994; Menzies et al., 1992).

O Si possibilita que a planta desenvolva uma barreira mecânica que impede o acesso do patógenos em seus tecidos. Barreiras mecânicas envolvem mudanças na anatomia, como células epidérmicas mais espessas e maior grua de silicificação e/ou lignificação. A sílica amorfa ou “opala”, localizada na parede celular, tem efeitos sobre as propriedades físicas desta. O acúmulo de Si nas células epidérmicas pode ser uma barreira física efetiva na penetração da hifa (Yoshida, 1965).

Além da barreira mecânica, o Si atua sobre os tecidos do hospedeiro afetando a interação entre hospedeiro e patógeno, conduzindo a uma ativação mais rápida dos mecanismos de defesa da planta (Chérif et al., 1992). Entre os mecanismos envolvidos na defesa das plantas aos patógenos é possível mencionar a síntese de compostos fenólicos e lignina, a ativação de enzimas de defesa tais como, polifenoloxidase, peroxidases e quitinases (Chérif et al., 1994).

Algumas doenças importantes em cevada, milho, pepino, uvas, morangos, centeio, arroz e trigo são efetivamente controladas pelo fornecimento de silício (Si) as plantas (Datnoff et al., 2007). Muitos componentes de resistência a certos patógenos foliares de arroz têm sido reforçados pela aplicação de Si. Seebold et al. (2001) encontraram que, embora o período de latência de *Pyricularia grisea* não diferiu entre algumas cultivares de arroz com diferentes níveis de resistência parcial à brusone, porém o período de incubação (PI) foi alongado com o fornecimento de silicato de cálcio ao solo, além de ocorrer uma diminuição significativa da eficiência de infecção, tamanho da lesão (TL), taxa de expansão de lesão, esporulação por lesão e área foliar doente.

O PI da queima das bainhas em arroz, causada por *Rhizoctonia solani*, não foi afetado pela aplicação de Si no solo, mas o número total de lesões, área abaixo da curva de progresso da extensão da lesão, gravidade da doença e maior a tamanho da lesão foram reduzidas (Rodrigues et al., 2003). Resende et al. (2009) relatou que o fornecimento de silicato de cálcio no solo reduziu a área abaixo da curva de progresso relativo da infecção e a severidade final da doença foram significativamente diminuídas nas folhas de sorgo de uma cultivar suscetível infectadas por *Colletotrichum sublineolum*.

Bélangier et al. (2003) relataram que as aplicações de Si na forma de soluções de nutrientes fornecidos exogenamente ou silicato de cálcio a plantas de trigo reduziu a doença do oídio, causado por *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. A diferença mais marcante entre as plantas que não receberam Si e as que foi fornecido o Si e infectadas com *B. graminis* f. sp. *tritici* foi a extensão da infecção das células epidérmicas e a colonização pelo fungo. Análise histológica e ultra-estrutural revelou que as células epidérmicas de plantas supridas com Si reagiu ao ataque de fungos com reações específicas de defesa, incluindo a formação da papila, a produção de calose e liberação de material osmiofílico elétron-denso, identificado pela rotulagem citoquímica como fenólicos glicosilados. Materiais fenólicos não só se acumulou ao longo das

paredes das células epidérmicas, mas também foi associado com alteração na integridade dos haustórios.

Domiciano et al., (2010) estudando os efeitos da aplicação de silicato de cálcio em solo sobre a mancha marrom causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana* em folhas de trigo, obteve aumentos significativos no período de incubação, reduções significativas na área abaixo da curva de progresso da mancha marrom, número de lesões por cm² de área foliar e severidade a gravidade da doença nas plantas que receberam Si. Além disso, nas plantas que receberam Si foi observado maiores valores de concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico durante os estágios mais avançados da infecção pelo fungo. Atividade da quitinase e peroxidase foi alta em estágios avançados de infecção pelo fungo nas folhas das plantas que receberam Si.

Silva et al., (2010) estudando os efeitos da aplicação de silicato de cálcio via solo em plantas de café e inoculadas com o nematóide de galhas *Meloidogyne exigua*, observaram que o número de galhas (NG) e número de ovos (NE) diminuíram significativamente com o fornecimento de Si independente da cultivar. A concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (LTGA) aumentaram significativamente em raízes de plantas das cultivares Catuaí e IAPAR 59 inoculadas com nematóide e supridas com Si. A atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) aumentou significativamente em raízes de plantas inoculadas em comparação com raízes de plantas não-inoculadas, independentemente da cultivar e do fornecimento de Si.

4.1 Silício e os processos fisiológicos das plantas

Diversos trabalhos relatam o efeito do Si nas plantas submetidas ao estresse abiótico envolvendo as EROs. Em condições de excesso de água, a atividade da SOD e da APX nas folhas de plantas trigo supridas com Si não apresentaram aumento em atividade enquanto que as atividades da POD e da CAT diminuíram (Gong et al., 2003). Plantas de pepino sob estresse salino e crescendo na presença de Si apresentaram aumento na atividade da SOD, GR e APX, exceto para a CAT (Zhu et al., 2004). O Si aumentou a atividade da SOD, POD, CAT e GR em folhas de plantas de cevada submetidas a estresse salino (Liang et al., 2003). Com relação a estresses bióticos, tem sido relatado que o Si influenciou mecanismos de defesa em pepino contra *Pythium* spp. pelo aumento da atividade de quitinases, peroxidases e polifenoloxidases (Samuels et al., 1993). Raízes de pepino infectadas com *Phytophthora melonis* tiveram maior

atividade da CAT e APX, além de uma correlação positiva entre as concentrações de Si e a atividade da CAT e APX nas plantas infectadas (Mohagheg et al., 2011).

Em pepineiros crescido em solução nutritiva contendo Si foi constatado aumento na concentração de clorofila, maior massa foliar (fresca e seca) específica, atraso na senescência e aumento da rigidez das folhas maduras (Adatia & Besford 1986). O fornecimento de Si melhora a arquitetura foliar e permite maior penetração de luz solar no dossel, maior absorção de CO₂ e diminuição da transpiração excessiva, o que permite o incremento da taxa fotossintética (Takahashi, 1995). Em plantas de arroz foi observado que, a suplementação com Si proporciona aumento na produção e massa individual de sementes, diminuição de esterilidade e do teor de Mn, e maior taxa fotossintética (Matoh et al., 1991; Pershin et al., 1995). O fornecimento de Si à plantas de arroz proporciona maior comprimento foliar de acordo com o desenvolvimento das plantas, e proporciona maior assimilação de CO₂, com isso, há maior translocação de assimilados para a produção de grãos, aumentando a produtividade (Takahashi, 1995). Também tem sido relatado que em arroz, o Si diminui a transpiração e a taxa da permeabilidade das membranas das plantas sob déficit hídrico (Agarie et al., 1998).

5. Referências

- Adatia, M. H., Besford, R. T. (1986). The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany*, 58, 343-351.
- Agarie, S., Uchida, H., Agata, W., Kubota, F., Kaufman, P. B. (1998). Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 1, 89-95.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Araújo, A. E. (2000). *Doenças da cultura do algodoeiro no cerrado*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO AGRONEGÓCIO DO ALGODÃO: V Seminário Estadual da Cultura do Algodão, Cuiabá-MT. Anais... p.189-195, 2000.
- Bastiaans, L. (1993). Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. Leaf photosynthesis. *Neth Journal Plant Pathology*, 99, 197-203.
- Bélanger, R. R., Benhamou, N., and Menzies, J. G. (2003). Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology*, 93, 402-412.

- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4019-4026.
- Campos-Vargas ,R., Saltveit, M. E. (2002). Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiologia Plantarum*, 114, 73-84.
- Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J. G., Bélanger, R. R. (1992). Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiological and molecular plant Pathology*, 41, 411-425.
- Chérif, M., Asselim, A., Bélanger, R. R. (1994). Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 84, 236-242.
- Cia, E., Salgado, C. L. (1997). Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.) (pp. 33-48). In: Kimati, H. E. (Ed.) *Manual de Fitopatologia*. 1997.
- CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de grãos safra 2010/2011*. Décimo Segundo levantamento, setembro/2011.
- Costa, A. S., Fraga Jr., C. G. (1939). Sobre a natureza da "ramulose" ou "superbrotamento" do algodoeiro. *Jornal de Agronomia*, 2, 151-160.
- Costa, A. S., Fraga Júnior, C. G. (1937). *Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro*. Campinas: Instituto Agrônômico, 23p. (Boletim Técnico, 19).
- Datnoff, L. E., Rodrigues, F. A., Seebold, K. W. (2007). Silicon and Plant Disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease* (pp 233-246). The American Phytopathological Society.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, 13454-13459.
- Epstein, E. (1999). Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.
- Freire, E. C. (2011). História do algodão no Cerrado. In: Freire, E. C. (Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil* (pp 23-61). Brasília: ABRAPA.
- Gong, H., Chen, K., Chen, G., Wang, S., Zhang, C. (2003). Effects of silicon on the growth of wheat and its antioxidative enzymatic system. *Chinese Journal of Soil Science*, 34, 55-57.

- Juliatti, F. C., Ruano, (1997). O. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) - Controle de doenças. In: Vale, F. X. R., Zambolim, L. (Ed.) *Controle de Doenças de Plantas* (pp. 555-558). Viçosa. UFV. 1997.
- Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H., Ding, R. X. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 160, 1157-1164.
- Lichtenthaler, H. K., Miehe, J. A. (1997). Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Science*, 2, 316-320.
- Lima, E. F., Carvalho, J. M. F. C., Carvalho, L. P. (1985). Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 10, 99-109.
- Malaguti, G. 1955. La escobilla del algodón en Venezuela. *Agronomia Tropical*, 5, 73-86.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Ed. London: Academic Press, Limited.
- Matoh, T., Murata, S., Takahashi, E. (1991). Effect of silicate application on photosynthesis of rice plants. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 63, 248-251.
- Mathieson, J. T., Mangano, V. (1985). Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 11, 115-118.
- Menzies, J. G., Bowen, P., Ehret, D. L., Glass, A. D. M. (1992). Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. *American Society for Horticultural Science (USA)*, 117, 902-905.
- Mitani, N., Ma, J. F. (2005). Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany*, 56, 12255-1261.
- Mohaghegh, P., Khoshgoftarmanesh, A. H., Shirvani, M. (2011). Effect of silicon on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Disease*, 95, 455-460.
- Moller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561-91.

- Morello, C. L., Farias, F. C. J., Silva Filho, J. L., Freire, E. C. *Cultivares de algodoeiro para o cerrado*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 8 p. (Embrapa Algodão. Circula Técnica, 93).
- Nascimento Jr. A., Athayde, M. L. F., Panizzi, R. C., Iamamoto, M. M., Barreto, M., Guerreiro, L. R. R. (1997). Transporte de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do índice da doença. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 50-54.
- Paranidharan, V., Palaniswami, A., Vidhyasekaran, P., Velazhahan, R. (2003). Induction of enzymatic scavengers of active oxygen species in rice in response to infection by *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25, 91-96.
- Pershi, B. M., Pershina, A. N., Egorina, L. M. (1995). Silicon and production in the Primorskii region. *Agrokimiya*, 10, 68-74.
- Resende, R. R., Rodrigues, F. A., Soares, J. M., Casela, C. R. (2009). Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal of Plant Pathology* 124, 533-541.
- Rodrigues, F.A., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J. B., Bélanger, R. R. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*, 93, 535-546.
- Samuels, A. L., Glass, A. D. M., Ehret, D. L., Menzies, J. G. (1993). The effects of silicon supplementation on cucumber fruit: Changes in surface characteristics. *Annual Botanic*, 72, 433-440.
- Santos, G. R., Zambolim, L., Batista, U. G. (1993). Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. *Summa Phytopathologica*, 19, 177-180.
- Saran, P. E. (2009). *Manual de doenças do algodoeiro: identificação, biologia e sintomas de danos*. Fazendo Mais pelo campo, 2009.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101, 7-12.
- Seebold, K. W., Kucharet, T. A., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, F. J., Machetti, M. A. (2001). The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology*, 91, 63-69.
- Silva, R. V., Oliveira, R. D. L., Nascimento, K. J. T., Rodrigues, F. A. (2010). Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. *Plant Pathology*, 59, 586-593.

- Suassuna, N. D. Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodoeiro. 2005. 82 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Suassuna, N. D., Coutinho, W. M. (2011). Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil* (pp 567-612). Brasília: Abrapa. 2011.
- Svalheim Ø, Robertsen B. (1993). Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyls segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell wall of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiologia Plantarum*, 88, 675-681.
- Tanaka, M. A. S., Menten, J. O. M. (1992). Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, 18, 138-177.
- Takahashi, E. (1995). Uptake mode and physiological functions of silica. In: Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K., Hirata, H. (Ed.). *Science of the rice plant: physiology*. (pp 420-433). Tokyo. Food and Agriculture Policy Research Center.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S., Wang, Z. (1996). Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*, 179, 261-268.
- Yoshida, S. (1965). Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science Series*, 15, 1-58.
- Zhang, G. L., Dai, Q. G., Zhang, H. C. (2006). Silicon application enhances resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*) in rice. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32, 600-606. (in Chinese).
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167, 527-533.

CAPÍTULO 1

Aspectos Bioquímicos da Resistência do Algodoeiro à Ramulose Potencializada pelo Silício

Resumo

A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma das doenças mais importantes do algodoeiro. O uso de silício (Si) reduz a intensidade de inúmeras doenças em várias espécies de plantas. Plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e Fiber Max (FM 993) foram cultivadas em vasos com solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício. Foram avaliados o período de incubação (PI), a incidência (I), a área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) e concentração foliar de Si. A concentração foliar de Si e o PI aumentaram em 76% e 19,5%, respectivamente, nas plantas supridas com Si em relação as que não receberam Si. A I e a AACIR diminuíram em 64 e 18%, respectivamente, nas plantas do tratamento +Si. A concentração dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) nas plantas das duas cultivares supridas com Si aumentaram durante o progresso da ramulose, porém inferiores em relação as plantas não supridas com Si. Nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, a atividade das enzimas quitinase (QUI) e glicanase (GLI) aumentou até os 10 dias após inoculação (dai) em relação às plantas que não receberam Si. A atividade das enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) na BRS Araçá suprida com Si aumentou entre os 20 e 30 dai em relação às plantas que não receberam Si, enquanto nas folhas da FM 993 supridas com Si o aumento na atividade da PPO e POX foi até os 10 dai. Na FM 993 suprida com Si houve aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL). O fornecimento de Si às plantas de algodoeiro aumentou a resistência à ramulose mediante incremento na concentração CFST e de DLATG nas duas cultivares, e na atividade das enzimas POX, PPO, QUI e GLI na BRS Araçá, e, POX e FAL na FM 993.

1. Introdução

Dentre as doenças que afetam a cultura do algodoeiro, a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa, destaca-se por causar perdas de até 85% na produção (Suassuna & Coutinho, 2011). O fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* infecta as folhas, pecíolos e caule provocando nanismo e superbrotamento dos ramos, o que prejudica a formação das maçãs e, conseqüentemente, o rendimento do algodão (Mehta et al., 2005).

Durante a interação patógeno-hospedeiro, ocorre uma série de eventos bioquímicos que levam a ativação de defesas por parte da planta, resultando na produção de compostos que podem ser tóxicos aos patógenos ou apenas restringir o seu desenvolvimento (Wróbel-Kwiatkowska et al., 2004).

A principal estratégia de controle dessa doença é o controle químico, visto que a maioria das cultivares de algodão utilizadas não possuem resistência genética a esta doença (Suassuna & Coutinho, 2011).

O silício (Si), apesar de não ser considerado essencial para o crescimento das plantas, pode ser absorvido pelo em níveis que excedem os macronutrientes (por exemplo, em arroz) (Epstein, 1999). Essencial ou não, o papel do Si nas plantas tem sido cada vez mais de interesse aos pesquisadores devido aos seus inúmeros benefícios principalmente quando as plantas estão sob condições de estresse. Do ponto de vista morfológico, a deposição e polimerização do ácido monossilícico abaixo da cutícula forma uma camada dupla cutícula-sílica (Yoshida, 1965). Isso impede ou atrasa a penetração de alguns patógenos (Kim et al., 2002). Outro mecanismo proposto é que o Si solúvel tenha um papel ativo, que potencializa mecanismos de defesa das plantas com o aumento na produção de compostos fenólicos, nos níveis de algumas classes de fitoalexinas e também na ativação de alguns genes que codificam proteínas PR (Chérif et al., 1994; Rodrigues et al., 2003, 2004, 2005). Além disso, o incremento na atividade de enzimas líticas à parede celular fúngica ou associadas com o metabolismo secundário da planta (Liang et al., 2005) reforçam a hipótese de que o Si potencializa mecanismos de defesa em plantas e não atua apenas de forma passiva na resistência. Em pepineiro, a aplicação foliar com Si controlou o míldio pulverulento, mas não foi capaz de potencializar a atividade das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e quitinases, ao contrário do que foi obtido em plantas supridas com Si via solo onde o controle da doença, além de ser efetivo, esteve associado com aumento na atividade dessas enzimas durante o processo infeccioso (Liang et al., 2005). No entanto, a exata natureza da

interação entre o Si solúvel com as vias bioquímicas de defesa da planta permanece desconhecida. Em todo caso, o uso de Si como uma medida alternativa de controle vem ganhando cada vez mais aceitação e é promissora aos produtores considerando os enormes prejuízos que as diferentes doenças tem causado na produção das mais diversas culturas.

Não existe nenhuma informação na literatura sobre o efeito de Si em reduzir a intensidade da ramulose em algodoeiro nem mesmo sobre os possíveis mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência. Assim, objetivou-se com este trabalho, investigar o efeito do Si na resistência do algodão à ramulose, bem como os mecanismos bioquímicos que possam estar supostamente envolvidos com o aumento da resistência.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro

Sementes de algodão das cultivares BRS Araçá e Fiber Max 993 (FM 993) foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por 2 min, seguidas de lavagem em água destilada por 3 min e germinadas em leito de areia lavada e autoclavada. Dez dias após a germinação, cinco plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada e constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca(NO₃)₂; 0,3 μM CuSO₄.5H₂O; 1,3 μM ZnSO₄.7H₂O; 46 μM H₃BO₃; 12,6 μM MnCl₂.4H₂O; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 45 μM FeSO₄.7H₂O-EDTA bissódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410, Industrial Grade Strong Base Anion Exchanger) (Ma & Takahashi, 2002) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) e 2 mM Si (+Si). Foi utilizada solução a meia força iônica incluindo a adição ou não do ácido monossilícico. Após 7 dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

2.2 Obtenção do inóculo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e inoculação das plantas

As plantas de algodoeiro foram inoculadas com o isolado CNPA 0053 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* fornecido pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa do Algodão. O isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi armazenado em tubos de ensaio contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). O isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA e as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C onde permaneceram por até 15 dias até ocorrer abundante produção de conídios. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 mL de água destilada em cada placa fazendo-se uma raspagem superficial com pincel de cerdas macias para liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^6$ conídios/mL pela contagem em hemacitômetro. Para aumentar a aderência dos conídios sobre o tecido da planta, a suspensão foi preparada utilizando água contendo gelatina a 1% (p:v), além da adição de Tween 20 (0,1 mL/100 mL de suspensão) para quebrar e tensão superficial da água.

Plantas de algodoeiro no estágio V5 (40 dias após transplante) (Marur & Ruano, 2001) foram inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando-se atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, USA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ com fluxo contínuo de luz por 24 h e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento com temperatura entre 25 e 35 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$ onde permaneceram até o final das avaliações.

2.3 Avaliação do período de incubação (PI), incidência e severidade da ramulose

Em cada vaso, foram marcadas cinco plantas para avaliação do PI, a partir das 24 horas após inoculação (hai). Avaliou-se a incidência (%) da ramulose no 5º dia após a inoculação (dai) contando-se o número de plantas por vaso que apresentavam sintomas da ramulose. Para avaliar a severidade da ramulose foi utilizada a escala de notas proposta por Costa & Fraga Júnior (1937), em que: 0 = plantas sem sintomas; 1 = plantas apresentando lesões necróticas nas folhas, pecíolos e nervuras; 2 = morte do ápice, hiperplasia e morte dos meristemas laterais; 3 = encurtamento dos internódios e início do superbrotamento e 4 = intenso superbrotamento e redução do porte e

desenvolvimento da planta, morte das partes afetadas. A severidade foi avaliada aos 10, 20 e 30 dai. As notas de severidade foram usadas para calcular o índice da ramulose (IR) de acordo com Mckinney (1923) em que: $IR = [(nota\ da\ doença \times\ número\ de\ plantas\ com\ essa\ nota) / (número\ total\ de\ plantas \times\ nota\ máxima\ da\ doença\ na\ escala)] \times 100$. Os valores do IR para as repetições de cada tratamento foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

2.4 Determinação da concentração foliar de Si

Aos 30 dai, a quarta e quinta folha das plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 20 mesh (0,84 mm), para determinação da concentração foliar de Si conforme proposto por Korndörfer et al. (2004).

2.5 Determinação da atividade de enzimas de defesa

Amostras da terceira, quarta e quinta folhas do ápice para a base das plantas de cada repetição, foram coletadas aos 5, 10, 20 e 30 dai. Amostras de folhas coletadas de plantas não inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (0 h) serviram como controle. As amostras foram mantidas em nitrogênio (N₂) líquido durante a coleta e armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

2.5.1 Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,2 g de folhas em N₂ líquido seguida de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de: 0,1 M tampão fosfato de potássio (pH 6,8); 1 mM fenilmetilsulfonilflúor (PMSF); 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. A atividade da POX foi determinada conforme metodologias propostas por Chance & Maehley (1955) e Kar & Mishra (1976). No

ensaio colorimétrico, utilizou-se pirogalol como substrato e peróxido de hidrogênio. A cada 1 mL do extrato de reação, foi adicionado 340 µL de água destilada, 250 µL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 µL de pirogalol 100 mM, 200 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM e 10 µL do extrato. As leituras de absorbância foram realizadas a 420 nm a cada 10 s durante um minuto em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade da POX foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955). A atividade da POX foi expressa em mmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5.2 Atividade da polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1)

A obtenção do extrato enzimático foi da mesma forma que para a POX. A atividade da PPO foi determinada conforme metodologias propostas por Chance & Maehley (1955) e Kar & Mishra (1976). No ensaio colorimétrico, utilizou-se o pirogalol a 100 mM como substrato. A cada 1 mL do extrato de reação, foi adicionado 520 µL de água destilada, 250 µL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 µL de pirogalol 100 mM e 30 µL do extrato. As leituras de absorbância foram realizadas a 420 nm a cada 10 seg durante um minuto em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley 1955).

2.5.3 Atividade de quitinasas (QUI, EC 3.2.1.14)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,2 g de folhas em N₂ líquido seguida de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), 1 mM PMSF e 200 mg de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. A determinação da atividade da QUI foi conforme metodologia proposta por Roberts & Selitrennikoff (1988), modificado por Harman et al. (1993), utilizando se como substrato o *p*-nitrofenil-β-D-N-N'-diacetilquitobiose (PNP) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O meio de reação contendo 470 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), 10 µL de PNP a 2 mg.mL⁻¹ e 20 µL do extrato vegetal foi incubado a 37 °C

por 2 h. A reação foi parada acrescentando-se 500 μL de acetato de sódio de 50 mM (pH 5,0). As leituras de absorvância foram realizadas a 410 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), imediatamente após a parada das reações. Foi utilizado para o cálculo o coeficiente de extinção molar de $7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a atividade da QUI expressa em mmol de *p*-nitrofenil produzido por $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.5.4 Atividade de β -1,3-glicanases (GLI, EC 3.2.1.6)

A obtenção do extrato enzimático foi da mesma forma que para a QUI. A atividade da GLI foi determinada conforme metodologia descrita por Lever (1972) com algumas modificações. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi usado em substituição à hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico. O meio de reação constituído de 230 μL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 250 μL da solução de substrato da laminarina (4 mg/mL) e 20 μL do extrato vegetal, sendo incubado a 45 °C por 30 min. Após esse período, acrescentou-se ao meio de reação 500 μL de DNS e, em seguida, esta mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min. Após o resfriamento em gelo até a temperatura de 30 °C, as amostras tiveram absorvância determinada a 540 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.5.5 Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5)

A atividade da FAL foi determinada pela quantificação calorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Umesha, 2006) com algumas modificações. O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,2 g de folhas em N_2 líquido seguida de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de tampão borato de sódio 50 mM (pH 8,3), 1 mM de EDTA, 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de tampão de ditioneitol (DTT) e 2% (p/v) de PVP. O homogenizado foi centrifugado a 20.000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. O meio de reação constituído de 500 μL de tampão Tris-HCl 25mM (pH 8,8), 500 μL da solução de substrato *L*-fenilalanina 50 mM e 100 μL do extrato vegetal, foi incubado a 40 °C por 1 hora. Após esse período, acrescentou-se ao meio de reação 200 μL de HCl 0,5N para paralisar a reação. A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm em espectrofotômetro

(Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), contra o tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (500 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), 500 μL de água destilada e 100 μL do extrato vegetal). Foi utilizado para o cálculo o coeficiente de extinção molar de 10000 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e a atividade da FAL foi expressa em μmol de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

2.6 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST)

Amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas em N_2 e imediatamente armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até análise. Amostras de 0,1 g representativas do material foliar foram maceradas em N_2 líquido. O macerado foi transferido para tubos plásticos para microcentrífuga, homogeneizado com 1,5 mL de metanol 80% e extraído durante 12 h em mesa agitadora orbital (150 rpm) a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^\circ\text{C}$). Os tubos foram cobertos com papel alumínio para proteger o extrato metanólico da oxidação pela luz. O extrato metanólico verde escuro foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e, após centrifugação, o sobrenadante foi transferido pra um novo tubo e o resíduo mantido a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico. A metodologia proposta por Zieslin & Ben-Zaken (1993), com algumas modificações, foi usada para determinação da concentração de CFST. Adicionaram-se 150 μL do reagente “Folin & Ciocalteau’s Phenol” 0,25 M (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 150 μL do extrato metanólico. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^\circ\text{C}$) por 5 min. Posteriormente, 150 μL de carbonato de sódio 1 M foram adicionados à mistura, a qual foi homogeneizada novamente e mantida a temperatura ambiente. Após 10 min, adicionou-se 1 mL de água destilada à mistura que permaneceu em temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^\circ\text{C}$) por 30 min. A absorbância das amostras foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de CFST foi expressa em mg de compostos fenólicos (expresso em catecol) por kg de folha fresca.

2.7 Determinação da concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG)

Adicionou-se 1,5 mL de água estéril ao resíduo obtido após a extração dos CFST. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por \approx 12 h. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi usado para determinação de lignina de acordo com a metodologia de Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 mL da solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) e HCl 2 N (1:10) foram adicionados ao resíduo seco. Os tubos foram levemente agitados para hidratar o resíduo e, em seguida, foram colocados em banho-maria (100 °C). Após 4 h, os tubos foram colocados no gelo por 10 min. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada estéril seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 1,5 mL de NaOH 0,5 M. A mistura foi agitada em mesa agitadora orbital (150 rpm) a temperatura ambiente (\approx 25 °C) por 12 h. A mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Após a adição de 200 μ L de HCl concentrado ao sobrenadante, os tubos foram transferidos para uma bandeja com gelo e mantidos na geladeira (4 °C) por 4 h para precipitação dos DLATG. Após a centrifugação a 10.000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, de cor laranja-amarronzado, foi dissolvido em 2 mL de NaOH 0,5 M. A leitura da absorbância foi realizada a 290 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração dos DLATG foi expressa em mg kg^{-1} de folha fresca utilizando-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 . Os fatores estudados foram duas cultivares de algodoeiro e duas doses de Si. Foram utilizadas seis repetições para obtenção dos dados do PI, incidência da ramulose, severidade e concentração foliar de Si. Para a coleta das amostras para as análises enzimáticas, foram utilizadas quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo cinco plantas de algodoeiro. Os dados obtidos

para cada variável foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo test-*t* ($P \leq 0,05$) utilizando o SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). A concentração foliar de Si foi correlacionada com o PI, incidência da ramulose e AACIR.

3. Resultados

3.1 PI, incidência, severidade da ramulose e concentração foliar de Si

O fator doses de Si foi significativo para PI, incidência, AACIR, e concentração foliar de Si. O fator cultivares e a interação cultivares \times doses de Si não foi significativo para as variáveis avaliadas (Tabela 1). O PI aumentou significativamente em 19,5% quando foram comparadas as plantas do tratamento +Si com as do tratamento -Si (Tabela 1). A incidência da ramulose e a AACIR foram reduzidas significativamente em 64 e 18%, respectivamente, quando compararam-se as plantas do tratamento +Si com as plantas do tratamento -Si (Tabela 1). A concentração foliar de Si aumentou em 76% na presença de Si (Tabela 1).

3.2 Correlação de Pearson

A correlação entre a concentração foliar de Si e o PI foi positiva e significativa ($r = 0,34$, $P \leq 0,01$) e negativa e significativa ($r = -0,44$ e $-0,70$, $P \leq 0,01$, respectivamente) para a incidência da ramulose e a AACPR.

3.3 Atividades de POX e PPO

Nas plantas da BRS Araçá supridas com Si, ocorreu aumento significativo na atividade da POX aos 20 e 30 dai, de 20 e 23%, respectivamente, quando comparadas com as plantas que não receberam Si (Fig. 1A). Nas plantas da FM 993 que receberam Si, houve aumento de 15% na atividade da POX aos 30 dai, quando comparadas as plantas que não receberam Si (Fig. 1B).

Nas plantas da BRS Araçá supridas com Si, houve aumento significativo de 37% na atividade da PPO aos 20 dai, quando comparadas com as plantas que não receberam Si (Fig. 2A). Nas plantas da FM 993 supridas com Si, não foi constatado aumento

significativo na atividade da PPO quando comparadas com as plantas não supridas com Si (Fig. 2B).

3.4 Atividades de QUI e GLI

Nas plantas da BRS Araçá supridas com Si, houve aumento significativo na atividade da QUI aos 10, 20 e 30 dai, de 415, 387 e 58%, respectivamente, quando comparados com as plantas do tratamento -Si (Fig. 3A). Em plantas da FM 993 supridas com Si foi constatado aumento na atividade da QUI aos 0 e 5 dai, de 17 e 180%, respectivamente, quando comparados com as plantas do tratamento -Si (Fig. 3B).

Em plantas da cultivar BRS Araçá supridas com Si, houve aumento na atividade da GLI aos 10, 20 e 30 dai, de 800, 300 e 15%, respectivamente, quando comparados com as plantas do tratamento -Si (Fig. 4A). Nas plantas da FM 993 supridas com Si, ocorreu aumento na atividade da GLI aos 0 e 30 dai, foram de 42 e 30%, respectivamente, quando comparados com as plantas que não receberam Si (Fig. 4B).

3.5 Atividade da FAL

Nas plantas da cultivar BRS Araçá supridas com Si, houve aumento na atividade da FAL aos 0 e 30 dai, de 576 e 30%, respectivamente, quando comparadas as plantas não supridas com Si (Fig. 5A). Para as plantas da FM 993 supridas com Si, houve aumento na atividade da FAL aos 10 e 30 dai, de 61 e 144%, respectivamente, em relação às plantas do tratamento -Si (Fig. 5B).

3.6 Concentrações de CFST e DLATG

Nas plantas da BRS Araçá supridas com Si, a concentração de CFST apresentou aumentos significativos apenas aos 0 dai, sendo esse aumento de 15% quando comparado com o das plantas não supridas com Si (Fig. 6A). Nas plantas da FM 993 supridas com Si, a concentração de CFST aumentou significativamente aos 0 e 30 dai, sendo esse aumento de 168 e 18,5%, respectivamente, quando comparado com as plantas não supridas com Si (Fig. 6B).

Nas plantas da BRS Araçá supridas com Si, a concentração de DLATG decresceu até os 10 dai, aumentou até os 30 dai (Fig. 7A); observou-se aumento

significativo de 28% aos 30 dai quando comparados os tratamentos +Si e -Si. Nas plantas da FM 993 supridas com Si, a concentração de DLATG aumentou entre 5 e 30 dai (Fig. 7B); não observou-se diferença significativa entre os tratamentos +Si e -Si.

4. Discussão

Neste estudo são apresentadas informações sobre as respostas bioquímicas de defesa do algodoeiro à infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* potencializadas pelo Si. A absorção e acúmulo de Si pelas plantas de algodoeiro, impactou negativamente o progresso da ramulose, assemelhando-se a outros estudos que mostram os efeitos benéficos do Si no controle de doenças em culturas economicamente importantes (Datnoff et al., 2007).

O fornecimento de Si as plantas das duas cultivares afetou o PI. Zadoks (1971) relatou que aumentos no PI podem reduzir o taxa de epidemia. Isso ocorre como consequência da diminuição no número de ciclos secundários do patógeno. A redução na AACIR devido ao fornecimento de Si, sugere que este elemento pode interferir a colonização do patógeno. O mecanismo de ação do Si na redução da ramulose ainda não é conhecido. No entanto, pode-se inferir que seu efeito pode ser devido à formação de barreiras (química e físicas) nas folhas das plantas de algodoeiro, que conferem resistência. Um dos mecanismos envolvidos na resistência das plantas mediada pelo Si, especialmente no patossistema arroz-*Pyricularia grisea*, foi atribuído a deposição do Si abaixo da cutícula (Kim et al., 2002). Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Shetty et al. (2011), que observaram atraso no aparecimento dos sintomas e redução na severidade do míldio pulverulento em roseira suprida com Si. Resende et al. (2009) obtiveram aumento no PI e PL₆₀ e redução da eficiência relativa de infecção e a área abaixo da curva do progresso da antracnose nas folhas de uma linhagem suscetível de sorgo com a aplicação de silicato de cálcio no solo.

No presente estudo, a concentração de CFST foi menor nas folhas das plantas supridas com Si, porém, foi capaz de aumentar a resistência das plantas das duas cultivares. Isso foi possível, pois os compostos fenólicos estão associados com as defesas das plantas aos patógenos e são encontrados tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). É relatado que a aplicação de Si pode levar a aumentos na produção de compostos fenólicos em plantas infectadas por patógenos (Carver et al., 1998; Rodrigues et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo corroboram aos obtidos por Dominicano et al. (2010) e Xavier Filha et al. (2011)

onde mostraram que valores inferiores na concentração de CFST nas folhas das plantas de trigo supridas com Si foi suficiente para reduzir a área abaixo da curva de progresso da mancha marron (AACPM) e a área abaixo da curva de progresso da brusone (AACPB).

Nas plantas das duas cultivares supridas com Si houve aumento na concentração de DLATG durante o processo infeccioso por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, principalmente nas plantas da FM 993. Porém estas concentrações foram menores às das plantas que não receberam Si. O Si pode ter contribuído para a maior resistência à ramulose, com redução na AACIR nas plantas das duas cultivares, mesmo com menor concentração de DLATG, enquanto as plantas sem Si apresentaram maiores concentrações de DLATG, e AACIR também foi maior. Os resultados deste estudo corroboram com os obtidos por Rodrigues et al. (2005). Estes autores observaram que a produção de DLATG foi menor nas folhas das plantas de arroz da cultivar M201 (suscetível) supridas com Si e inoculadas com *P. grisea*. Isso mostra que, mesmo com menores concentrações de DLATG nas células das folhas das plantas de algodoeiro, houve impacto negativo sobre a colonização por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

A atividade das enzimas POX e PPO foi maior nas folhas das plantas da BRS Araçá supridas com Si, principalmente aos 20 dai. É possível que o Si está potencializando a atividade destas enzimas. Estes resultados corroboram com os obtidos por Rodrigues et al. (2005), os quais demonstraram que, a quantidade de transcritos do gene POX aumentou durante o processo infeccioso de *P. grisea* em plantas de arroz de cultivares com reação incompatível e compatível supridas ou não com Si. Nas folhas das plantas da cultivar FM 993 houve aumento na atividade das enzimas POX e PPO durante o processo infeccioso, porém nas folhas das plantas suprida com Si a atividade dessas enzimas foi menor ao observado nas folhas das plantas não supridas com Si. Provavelmente, o Si não esteve potencializando a atividade da POX e PPO na cultivar FM 993. Silva et al. (2010) mostraram que a atividade da POX em plantas de algodoeiro infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou duas tendências com relação à sua atividade, maior no início do processo infeccioso para as cultivares BRS Antares (resistente) e CNPA Precoce I (suscetível), enquanto as cultivares BRS Cedro (moderadamente resistente) e BRS 187 8H (moderadamente suscetível), aumentaram a atividade da POX ao longo do processo infeccioso. Com isso, pode-se inferir que a atividade das enzimas PPO e POX ocorre de maneiras diferentes, de acordo com a cultivar.

Neste estudo, a atividade da POX estar associada com o aumento na concentração de lignina nas folhas das plantas das duas cultivares, supridas ou não com Si. As POXs têm várias funções fisiológicas que podem contribuir para a resistência da planta a patógenos, como, por exemplo, a biossíntese de compostos fenólicos (Schmid & Feucht, 1980), lignificação das paredes celulares (Walter, 1992) e inibição do crescimento fúngico (Macko et al., 1968). Enquanto isso, é provável que a PPO esteja relacionada com as defesas das plantas, produzindo compostos tóxicos ao patógeno, evidenciado pelas concentrações dos CFST. A PPO exerce um papel importante na defesa das plantas, oxidando compostos fenólicos em quinonas, as quais são tóxicas aos patógenos; as quinonas também podem se ligar à proteínas e carboidratos produzindo compostos que atuam com barreira física aos patógenos (Abdel-Aal et al., 2001).

A atividade das enzimas QUI e GLI foi maior nas folhas das plantas da BRS Araçá supridas com Si. A resistência da BRS Araçá aparentemente, está envolvida com a maior atividade dessas enzimas nas plantas supridas com Si. Houve aumento na atividade das enzimas QUI e GLI durante o processo infeccioso, porém nas folhas das plantas da FM 993 supridas com Si a atividade dessas enzimas foi inferior ao observada nas plantas não supridas com Si. O Si não está envolvido com aumento na atividade destas enzimas, porém, elas integram o sistema de defesa das plantas da FM 993 à ramulose. Os resultados obtidos para as plantas da FM 993 corroboram com os encontrados por Rodrigues et al. (2005), que demonstraram que, na interação compatível arroz-*M.grisea*, houve maior expressão dos genes da QUI e GLI nas plantas não supridas com Si. As enzimas QUI e GLI em plantas são importantes no sistema de defesa, não só porque afetam o crescimento de fungos, mas por provocar a dissolução das paredes das células fúngicas. QUI e GLI também são capazes de liberar, indiretamente, oligômeros de quitina que desencadeiam outras importantes reações de defesa celular, como a produção de compostos fenólicos e aumento na biossíntese de lignina (Sharma et al., 2011).

Nas folhas das plantas da BRS Araçá supridas com Si, a atividade da FAL foi menor dos 20 aos 30 dai, em relação às plantas que não receberam Si. Por outro lado, nas folhas das plantas da FM 993 supridas com Si, a atividade da FAL foi maior. A FAL catalisa a desaminação do aminoácido *L*-fenilalanina com a formação do ácido trans-cinâmico, que é o precursor de vários tipos de compostos fenólicos, sendo a lignina o produto final (Campbell & Sederoff, 1996). Os resultados obtidos corroboram com aqueles encontrados por Liang et al. (2005), ao quais estudaram plantas de pepino

supridas com Si e inoculadas com *Podosphaera xanthii*; observaram um aumento na atividade da FAL nas plantas supridas com Si, quando comparadas com as plantas não supridas com este elemento. Provavelmente, a resistência exercida pelo Si na cultivar FM 993 provavelmente está envolvida com a atividade da FAL, que aumenta a produção de CFST e DLATG.

Os resultados obtidos nas condições deste estudo permitem inferir que, plantas de algodoeiro das duas cultivares testadas e supridas com Si, foram mais resistentes à ramulose mediante aumento na concentração de compostos fenólicos e de derivados da LTGA, além de aumento na atividade das enzimas POX, PPO, QUI e GLI nas plantas da cultivar BRS Araçá, e das enzimas POX e FAL nas plantas da cultivar FM 993. Vale ressaltar que além destes mecanismos, existem outros, que não foram estudados aqui, mas que estão envolvidos na resistência do algodoeiro à ramulose.

5. Referências

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Sosulski F. W., Graf, R., Gillott, C., Pietrzak L. (2001). Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4, 3559-3566.
- Barber, M. S., Ride, J. P. (1988). 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.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Campbell, M. M., Sederoff, R. R. (1996). Variation in lignin content and composition. *Plant Physiology*, 110, 3-13.
- Carver, T. L. W., Robbins, M. P., Thomas, B. J., Troth, K., Raistrick, N., Zeyen, R. J. (1998). Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52, 245-257.
- Chance, B., Maehley, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. ethods in *Enzymology*, 2, 764-775.
- Chérif, M., Asselim, A., Bélanger, R. R. (1994). Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 84, 236-242.

- Costa, A. S., Fraga Júnior, C. G. (1937). *Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro*. Campinas: Instituto Agrônômico, 23p. (Boletim Técnico, 19).
- Datnoff, L. E., Rodrigues, F. A., Seebold, K. W. (2007). Silicon and Plant Disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease* (pp 233-246). The American Phytopathological Society.
- Domiciano, G. P., Rodrigues, F. A., Vale, F. X. R., Xavier Filha, M. S., Moreira, W. R., Andrade, C. C. L., Pereira, S. C. (2010). Wheat Resistance to Spot Blotch Potentiated by Silicon. *Journal Phytopathology*, 158, 334–343.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Pietro, A. D., Peterbauer, C., and Tronsmo, A. (1993). Quitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of Quitobiosidase and endoquitinase. *Phytopathology*, 83, 313-18.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Cal agric. Exp. Sta. Cir.* 32.
- Kar, M., Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
- Kim, S. G., Kim, K. W., Park, E. W., Choi, D. (2002). Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves, a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92, 1095-1103.
- Korndörfer, G. H., Pereira, H. S., Nolla, O. A. (2004). *Análise de silício: solo, planta e fertilizante*. Uberlândia, MG, Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia, 34p.
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 47, 273-279.
- Liang, Y. C., Sun, W. C., Si, J., Römheld, V. (2005). Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology*, 54, 678-685.
- Ma, J. F., Takahashi, E. (2002). Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. *Elsevier Science*.
- Macko, V., Woodbury, W., Stahmann, M. A. (1968). The effect of peroxidase on the germination and growth on mycelium of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Phytopathology*, 58, 1250-1254.

- Marrur, C. J., Ruano, O. (2001). A reference system of determination of cotton plant development. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, 5, 313-317.
- McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195-218.
- Mehta, Y. R., Zandoná, C., Bibanco, K., Almeida, W. P., Teixeira, E. A., Cunha, H. C., Erivaldo, J. (2005). Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica*, 31, 142-145.
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compound and their role in disease resistance. *Annual Review Phytopathology*, 30, 369-389
- Resende, R. R., Rodrigues, F. A., Soares, J. M., Casela, C. R. (2009). Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 533-541.
- Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and bacterial *Chitinases* differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, 134, 169-76.
- Rodrigues, F. A., Jurick, W. M., Datnoff L. E., Jones J. B., Rollins J. A. (2005). Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66, 144-159.
- Rodrigues, F. A., McNally, D. J., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J. G., Bélanger, R. R. (2004). Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*, 94, 177-183.
- Rodrigues, F.A., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J. B., Bélanger, R. R. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*, 93, 535-546.
- Schmid, P. S., Feucht, W. (1980). Tissue-specific oxidative browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. *Gartenbauwissenschaft*, 45, 68-73.
- Shaner, G., Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67, 1051-1056.
- Sharma, N., Sharma, K. P., Gaur, R. K., Gupta, V. K. (2011). Role of chitinase in plant defense. *Asian Journal of Biochemistry*, 6, 29-37.
- Silva, F. A. C., Santos, R. C., Azevedo Neto, A., Granja, M. M. C., Souza, C. C. F., Melo Filho, P. A. (2010). Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em

resposta a inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Tropical Plant Pathology*, 35, 114-118.

Shetty, R., Jensen, B., Shetty, N. P., Hansen, M., Hansen, C. W., Starkey, K. R., Jorgensen, H. J. L. (2011). Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02493.x

Suassuna, N. D., Coutinho, W. M. (2011). Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil* (pp 567-612). Brasília: Abrapa. 2011.

Umesha, S. (2006). Phenylalanine ammonia lyase in tomato seedlings and its relationships to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica*, 34, 68-71.

Walter, M. H. (1992). Regulation of lignification in defense. (pp 327-352). In: *Genes Involved in Plant Defense*. Boller, T., Meins, F. (Eds). New York: Springer-Verlag.

Wróbel-Kwiatkowska, M., Loernc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmianski, J., Kepczynska, E., Szopa, J. (2004). Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 245-256.

Yoshida, S. (1965). Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science Series*, 15, 1-58.

Zadoks, J. C. (1971). Systems analysis and the dynamics of epidemics. *Phytopathology*, 61, 600-610.

Zieslin, N., Ben-Zaken, R. (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 333-339.

Xavier Filha, M. S., Rodrigues, F. A., Domiciano, G. P., Oliveira, H. V., Silveira, P. R., Moreira, W. R. (2011). Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology*, 40, 28-38.

Tabela 1. Período de incubação (PI), incidência da ramulose (I), área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) e concentração foliar de Si em plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Fatores	Variáveis			
Silício	PI (dias)	Incidência (%)	AACIR	Si (g/kg)
-Si	4,25	91,67	1441,75	1,4
+Si	5,08	58,30	1188,92	5,9
DMS	0,75*	22,78*	85,07*	0,9*
Cultivares				
BRS Araçá	4,66	75,00	1290,83	3,8
FM 993	4,66	75,00	1339,83	3,4
DMS	0,83 ^{ns}	27,14 ^{ns}	85,09 ^{ns}	2,1 ^{ns}
C.V. (%)	18,97	35,61	7,66	28,33
Valores de F				
Cultivar (C)	0,99 ^{ns}	0,1 ^{ns}	1,42 ^{ns}	0,83 ^{ns}
Silício (Si)	5,32*	9,35**	37,78**	112,69**
C × Si	1,92 ^{ns}	2,34 ^{ns}	0,47 ^{ns}	3,49 ^{ns}

** e * $P \leq 0,01$ e $0,05$: significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste- F
C.V. = coeficiente de variação; ^{ns}: não significativo; * $P \leq 0,05$: significativo a 5% de probabilidade pelo teste- t .

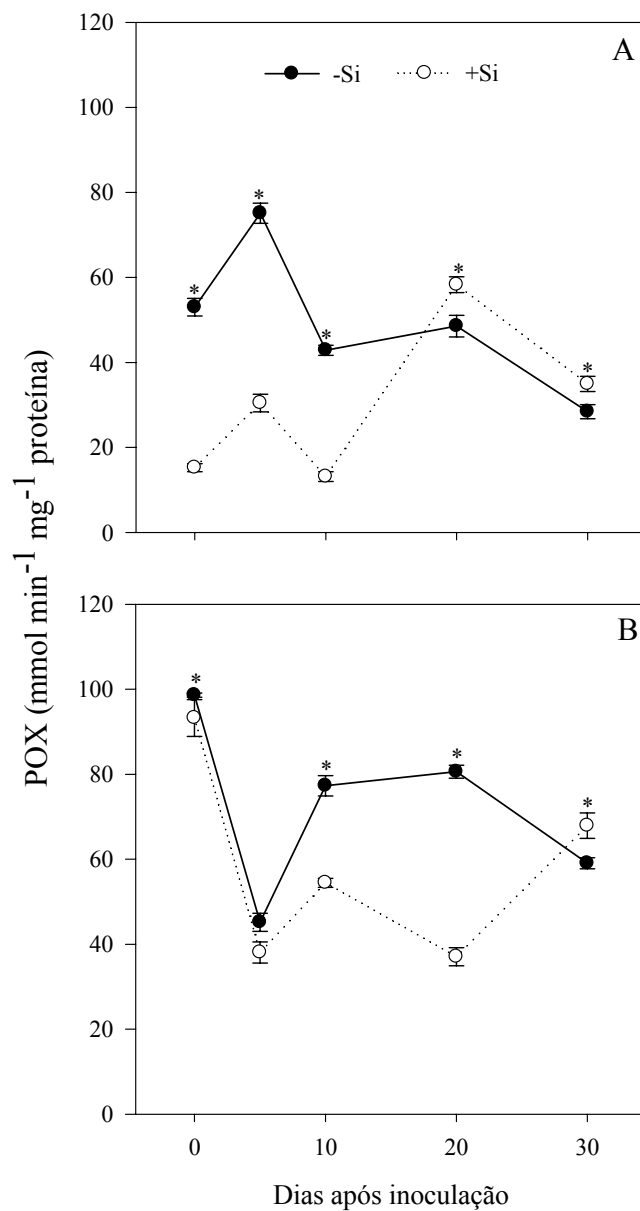


Figura 1. Atividade da peroxidase (POX) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

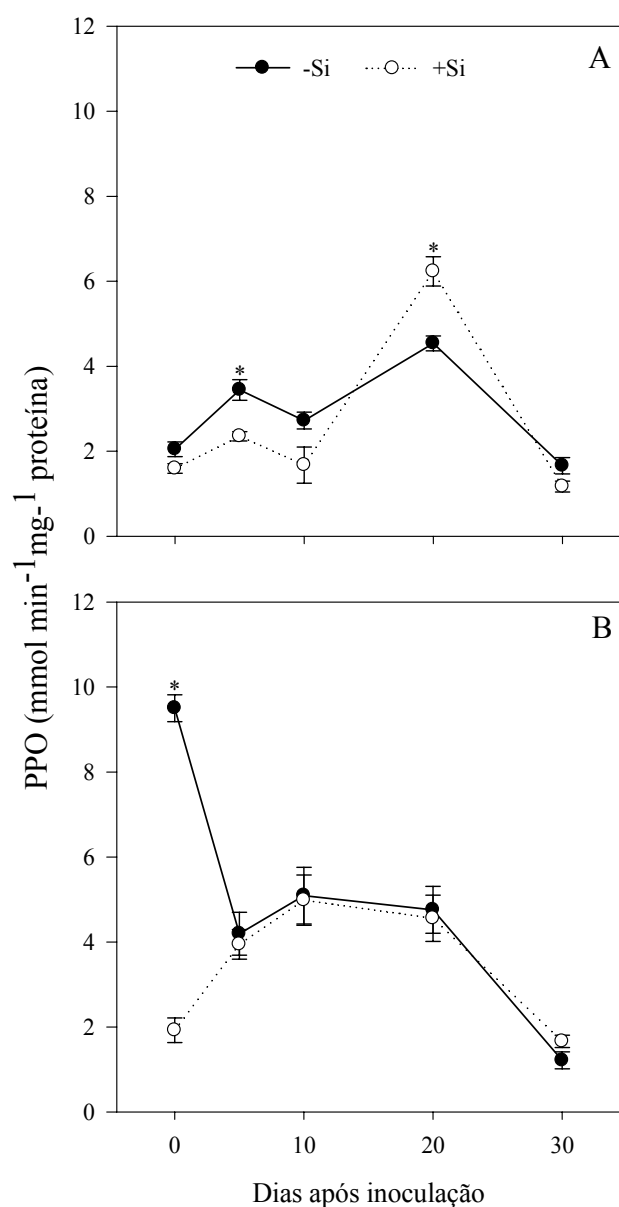


Figura 2. Atividade da polifenoloxidase (PPO) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

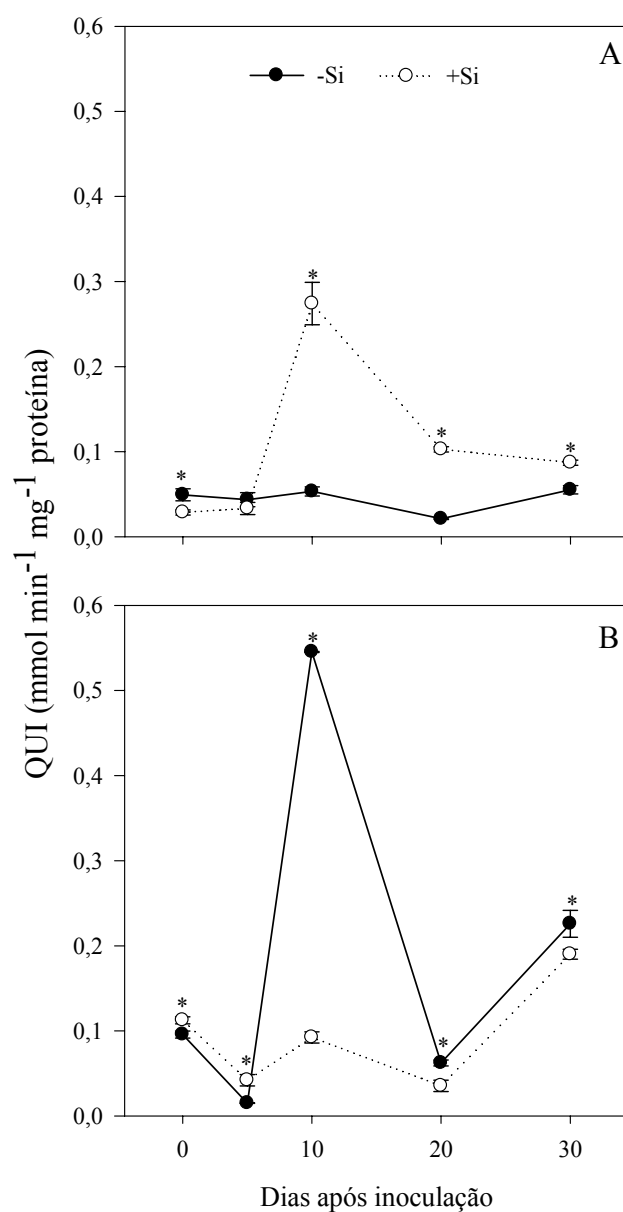


Figura 3. Atividade da quitinase (QUI) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

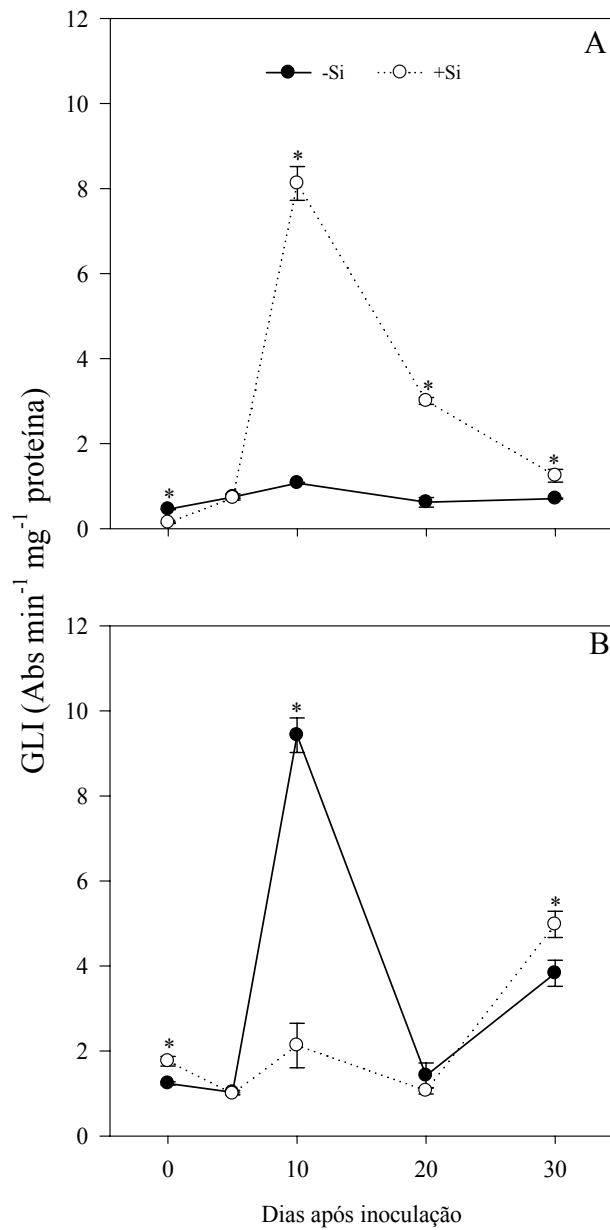


Figura 4. Atividade da glicanase (GLI) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

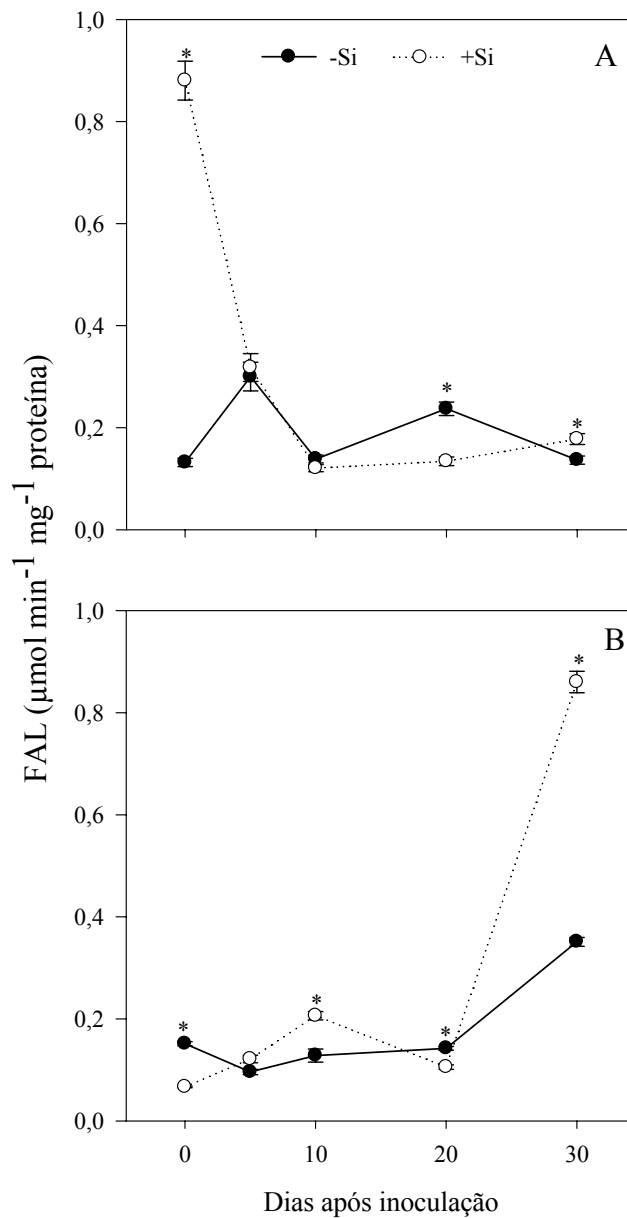


Figura 5. Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

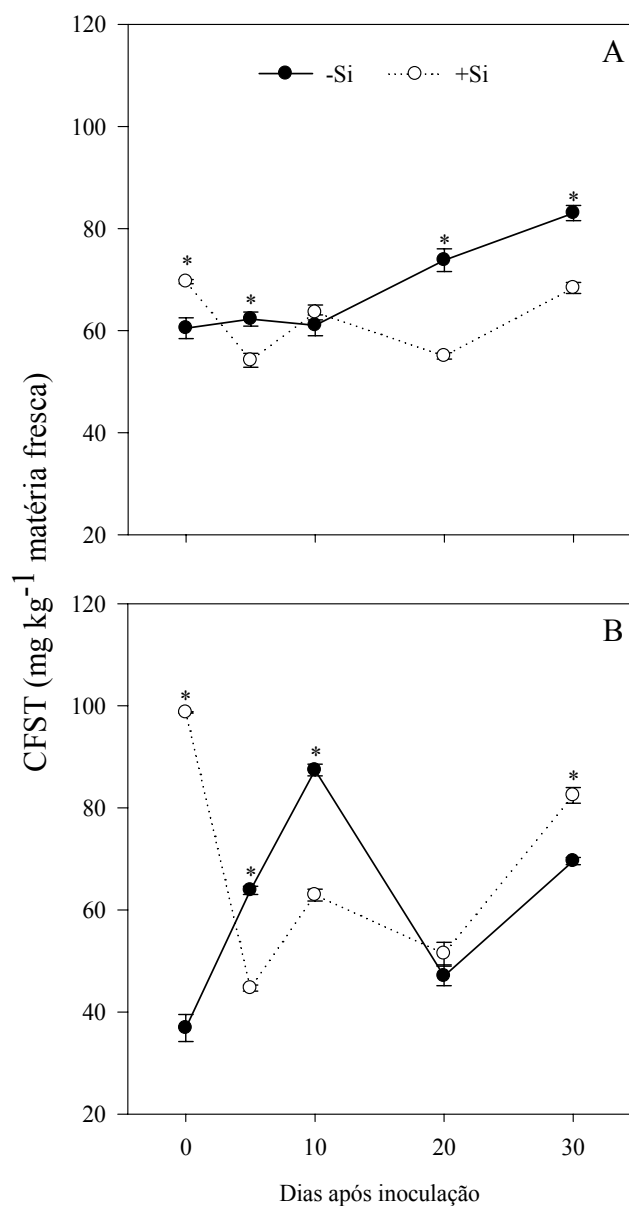


Figura 6. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

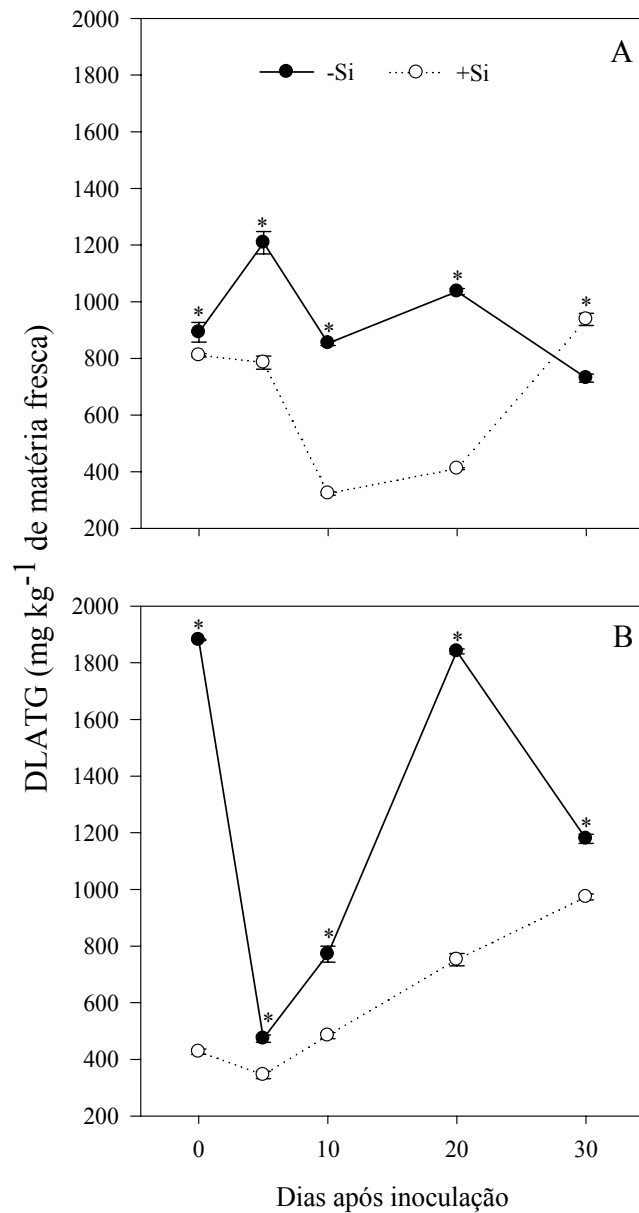


Figura 7. Concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 2

Capacidade Fotossintética de Plantas de Algodoeiro Infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e Supridas com Silício

Resumo

Nas plantas atacadas por patógenos, ocorrem danos nas células do mesofilo, colonização dos espaços intra e intercelulares e fechamento de estômatos, afetando a transpiração, influxo do CO₂ e a taxa fotossintética. O uso de silício (Si) é importante para reduzir a intensidade de inúmeras doenças em várias espécies de plantas, além de ter um efeito positivo sobre a capacidade fotossintética das plantas. objetivou-se com este estudo, investigar o efeito do Si sobre a capacidade fotossintética de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e FM 993 infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e supridas (+Si) ou não (-Si) com Si. Foram avaliadas as variáveis de trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a), a eficiência fotossintética do uso da água (A/C_i) e a concentração de pigmentos. A infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* afetou todas as variáveis de trocas gasosas nas duas cultivares. Houve redução da A, da g_s , da fixação de carbono, das concentrações de clorofila a (cl_a), clorofila b (cl_b) e carotenóides, da matéria seca total (MST) e aumentando a E. O fornecimento de Si as plantas das duas cultivares de algodoeiro aumentou a A devido ao aumento na g_s e na fixação de CO₂. O suprimento de Si aumentou as concentrações de cl_a , cl_b e carotenóides e MST nas duas cultivares. Portanto, o Si afetou a fisiologia das plantas de algodoeiro infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, aumentando a resistência à ramulose devido a incrementos na capacidade fotossintética, na concentração de pigmentos e no acúmulo de biomassa.

1. Introdução

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch) é suscetível à inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus (Suassuna & Coutinho, 2011). Uma das doenças mais importantes que afeta a cultura do algodoeiro no Brasil é a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa (Suassuna & Coutinho, 2011). O patógeno infecta as folhas, pecíolos e o caule, provocando nanismo e o superbrotamento dos ramos. Há prejuízos para a formação das maçãs e, conseqüentemente, para a produção (Mehta et al., 2005).

Considerando que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é um patógeno hemibiotrófico, é na fase necrotrófica que o fungo causa substanciais modificações na fisiologia do algodoeiro, devido à secreção de enzimas líticas e de toxinas não específicas. Do ponto de vista fisiológico, um dos principais danos causados pelos patógenos que atacam a aérea foliar é sobre os processos fotossintéticos (Berger et al., 2007). Características fotossintéticas, tais como as trocas gasosas e a fluorescência clorofila *a* têm sido consideradas como indicadores úteis do comportamento da atividade do aparelho fotossintético em plantas sob condições de estresse, incluindo o causado por patógenos (Berger et al., 2007; Lichtenthaler & Miehe, 1997). Vários estudos têm demonstrado que a infecção por patógenos leva a uma diminuição da fotossíntese (Bastiaans, 1993; Berger et al., 2007) e modificações no aparelho fotossintético (Lichtenthaler & Miehe, 1997).

Pinkard & Mohammed (2006) verificaram mudanças nos parâmetros fotossintéticos de *Eucalyptus globulus* em resposta à infecção por *Mycosphaerella* sp., os autores obtiveram uma relação linear negativa entre a luz saturada e a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) a nível de folha e os danos causados devido à infecção. Reduções em A foram proporcionalmente maiores do que o esperado simplesmente pela redução na área foliar fotossinteticamente ativa, sugerindo que os tecidos assintomáticos também foram afetados pela infecção (Pinkard & Mohammed, 2006). Mudanças na abertura estomática, nas reações bioquímicas, no número e estrutura dos cloroplastos, na secreção de enzimas líticas e enzimas em tecidos assintomáticos ocorrem em plantas atacadas por patógeno (Pinkard & Mohammed, 2006). Alves et al. (2011) estudaram o efeito da infecção por *Puccinia psidii* sobre as trocas gasosas em *Eucalyptus urophylla*. Observaram que as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* foram praticamente

inalteradas em um clone resistente, enquanto no clone suscetível, as taxas fotossintéticas foram afetadas principalmente por limitações bioquímicas na fixação do carbono.

A concentração de pigmentos nas folhas e a integridade da membrana são cruciais para a manutenção da A em plantas (Matsuda et al., 2004). Redução na concentração de pigmentos nas folhas causados por vários patógenos tais como *Exsorohilum turcicum* em milho (Chauhan et al., 1997) e *Bipolaris sorokiniana* em *Poa pratiensis* (Hodges & Campbell, 1999) ocasionaram redução na taxa fotossintética.

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na Terra, porém seu papel na biologia e fisiologia vegetal não foi claramente entendido (Epstein, 1999). Apesar de não ser considerado um elemento essencial para as plantas superiores (Epstein, 1999), muitos efeitos benéficos desse elemento têm sido demonstrados em várias espécies de plantas, especialmente sob condições de estresses bióticos (Adatia & Besford, 1986; Ma, 2004) ou abióticos (Ma & Yamaji, 2006; Ranganathan et al., 2006). Tem sido relatado que aplicações de Si podem reduzir a intensidade de várias doenças (Rodrigues et al., 2003; Ranganathan et al., 2006), a toxidez de alguns metais pesados, como boro e manganês (Hodson & Sangster, 2002; Gunes et al., 2007; Feng et al., 2009) e o estresse salino (Gong et al., 2003; Liang et al., 2006). Em arroz, o Si diminuiu a transpiração e a taxa da permeabilidade das membranas das plantas sob déficit hídrico (Agarie et al., 1998). Em sorgo sob déficit hídrico, a aplicação de Si aumentou o conteúdo relativo de água e o peso da matéria seca das plantas (Hattori et al., 2005). Os autores sugeriram que o aumento na tolerância à seca pela adição de Si esteve associada com o aumento na capacidade de absorção de água. O suprimento de Si às plantas de trigo melhorou o status hídrico e aumentou a massa seca das plantas (Gong et al., 2003). O aumento na tolerância das plantas de trigo à seca mediada pelo Si foi devido ao aumento na capacidade da defesa antioxidante e a redução de danos oxidativos (Gong et al., 2003).

Não há informações disponíveis na literatura sobre o efeito do Si nos parâmetros fotossintéticos de plantas de algodoeiro em resposta à infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do Si nas trocas gasosas de plantas de algodoeiro infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro

Sementes de algodão das cultivares BRS Araçá e Fiber Max 993 (FM 993) foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por 2 min, seguidas de lavagem em água destilada por 3 min e germinadas em leito de areia lavada e autoclavada. Dez dias após a germinação, cinco plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada e constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca(NO₃)₂; 0,3 µM CuSO₄.5H₂O; 1,3 µM ZnSO₄.7H₂O; 46 µM H₃BO₃; 12,6 µM MnCl₂.4H₂O; 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 45 µM FeSO₄.7H₂O-EDTA bissódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410, Sigma-Aldrich, São Paulo) (Ma & Takahashi, 2002) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) e 2 mM Si (+Si). Foi utilizada solução a meia força iônica incluindo a adição ou não do ácido monossilícico. Após 7 dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

2.2 Obtenção do inóculo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e inoculação das plantas

As plantas de algodoeiro foram inoculadas com o isolado CNPA 0053 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* fornecido pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa do Algodão. O isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi armazenado em tubos de ensaio contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). O isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA e as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C onde permaneceram por até 15 dias até ocorrer abundante produção de conídios. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 mL de água destilada em cada placa fazendo-se uma raspagem superficial com pincel de cerdas macias para liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^6$ conídios/mL pela contagem em hemacitômetro. Para aumentar a aderência dos conídios sobre o tecido da planta, a suspensão foi preparada utilizando água contendo gelatina a

1% (p:v), além da adição de Tween 20 (0,1 mL/100 mL de suspensão) para quebrar e tensão superficial da água.

Plantas de algodoeiro no estágio V5 (40 dias após transplante) (Marur & Ruano, 2001) foram inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando-se atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, USA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ com fluxo contínuo de luz por 24 h e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento com temperatura entre 25 e 35 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$ onde permaneceram até o final das avaliações.

2.3 Avaliação da severidade

A severidade da ramulose foi avaliada utilizando a escala de notas proposta por Costa & Fraga Júnior (1937) em que: 0 = plantas sem sintomas; 1 = plantas apresentando lesões necróticas nas folhas, pecíolos e nervuras; 2 = morte do ápice, hiperplasia e morte dos meristemas laterais; 3 = encurtamento dos internódios e início do superbrotamento e 4 = intenso superbrotamento e redução do porte e desenvolvimento da planta, morte das partes afetadas. A severidade foi avaliada aos 10, 20 e 30 dias após inoculação (dai). As notas de severidade foram usadas para calcular o índice da ramulose (IR) de acordo com o índice de McKinney (1923) em que: $IR = [(nota\ da\ doença \times\ número\ de\ plantas\ com\ essa\ nota) / (número\ total\ de\ plantas \times\ nota\ máxima\ da\ doença\ na\ escala)] \times 100$. Os valores do IR para as repetições de cada tratamento foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

2.4 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E), a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) e a eficiência fotossintética do uso da água (A/C_i) foram determinadas na quarta folha, do ápice para a base, em uma planta que se encontravam no estágio V5 (Marur & Ruano, 2001) por repetição de cada parcela. As avaliações foram realizadas entre às 8:00 e 11:00 h, em sistema aberto, sob irradiância de saturação de $1000 \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, utilizando-se um analisador de gases infravermelho (LC pro+, Analytical Development

Company, Hoddesdon, Reino Unido). Durante as avaliações, a umidade relativa do ar foi de $\approx 80 \pm 5\%$, a temperatura foliar variou de 28 a 33 °C e a concentração ambiente de CO₂ foi cerca de 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Para permitir a ativação plena da atividade da maquinaria fotossintética, as plantas foram mantidas cerca de meia hora fora da câmara de nebulização, a pleno sol, antes das avaliações. As avaliações foram realizadas aos 5, 10, 20 e 30 dias após inoculação (dai) em uma planta por repetição de cada tratamento. As avaliações também foram realizadas nas plantas não inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (0 h).

2.5 Determinação da concentração de pigmentos

Para a determinação da concentração dos pigmentos nas folhas, amostras de 100 mg da quarta folha das plantas de cada repetição foram coletadas aos 0, 10, 20 e 30 dai. As amostras foram trituradas em nitrogênio (N₂) líquido contendo 0,01 g de carbonato de cálcio e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL de acetona 80% (v/v) por 1 min sob luz verde. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman # 1. O resíduo foi lavado três vezes em acetona a 80% e o volume final completado em balão volumétrico para 25 mL, com o mesmo solvente. As absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm. As concentrações de clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b) e carotenóides foram estimadas de acordo com Lichtenthaler (1987).

2.6 Massa seca e razões alométricas

Foram realizadas análises destrutivas das plantas inoculadas e não inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de cada cultivar aos 30 dai. As plantas foram separadas em limbo foliar, pecíolos, caules e raízes. A área das folhas de cada planta foi obtida com o equipamento medidor de área foliar LiCor 3100 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Todas as partes da planta foram secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante e, em seguida, pesadas.

Com os valores de biomassa seca, obtiveram-se as seguintes variáveis de acordo com Hunt (1990):

Matéria Seca Total (MST): somatório da matéria seca de todas as partes da planta.

Razão de Massa Foliar (RMF): razão entre a biomassa seca alocada para a folha em relação à biomassa total.

$$\text{RMF} = W_{\text{folha}}/W_{\text{total}}$$

Razão de Massa Caulinar (RMC): razão entre a biomassa seca alocada para no caule em relação à biomassa total.

$$\text{RMC} = W_{\text{caule}}/W_{\text{total}}$$

Razão de Massa Radicular (RMR): razão entre a biomassa seca alocada na raiz em relação à biomassa total.

$$\text{RMR} = W_{\text{raiz}}/W_{\text{total}}$$

Razão de Massa do Pecíolo (RMP): razão entre a biomassa seca alocada no pecíolo em relação à biomassa total.

$$\text{RMP} = W_{\text{pecíolo}}/W_{\text{total}}$$

Área Foliar Específica (AFE - $\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$): trata-se da razão entre a área da folha em relação a massa da folha.

$$\text{AFE} = L_a/W_{\text{folha}}$$

Razão de Área Foliar (RAF - $\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$): trata-se da razão entre a área da folha em relação a massa seca total da planta.

$$\text{RAF} = L_a/W_{\text{planta}}$$

2.7 Determinação da concentração foliar de Si

Aos 30 dai, as folhas das plantas das repetições dos tratamentos foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 20 mesh (0,84 mm), para determinação da concentração foliar de Si conforme proposto por Korndörfer et al. (2004).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foi conduzido um experimento instalado em delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, com dez repetições. Os fatores estudados foram duas cultivares de algodoeiro, duas formas de inoculação (plantas não inoculadas e inoculadas) e duas doses de Si. Foram utilizadas dez repetições para avaliação de

trocas gasosas, análise de crescimento, severidade e análise foliar de Si; para pigmentos, foram utilizadas apenas quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo cinco plantas de algodão. Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste-*t* ($P \leq 0,05$) ou pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). O índice de ramulose foi correlacionado com as médias obtidas para as variáveis fotossintéticas. As variáveis fotossintéticas também foram correlacionadas entre si.

3. Resultados

3.1 Índice da ramulose e concentração foliar de Si

Os valores do índice da ramulose nas plantas de algodoeiro das duas cultivares supridas com Si foram menores em relação aos obtidos para as plantas das duas cultivares não supridas com esse elemento (Tabela 1). Houve interação significativa entre os fatores cultivares \times doses de Si para a AACIR (Tabela 1). Houve interação significativa entre os fatores cultivares \times doses de Si para a concentração foliar de Si (Tabela 1).

3.2 Trocas gasosas

Houve efeito significativo do fator inoculação para as variáveis A , g_s , C_i/C_a , e A/C_i (Tabela 2). Houve efeito significativo do fator cultivares para a variável E (Tabela 2). Houve efeito do fator doses de Si para todas as variáveis avaliadas (Tabela 2). A interação entre os fatores cultivares \times inoculação foi significativa para a variável E (Tabela 3), e a interação entre os fatores inoculação \times doses de Si foi significativa para a variável C_i/C_a (Tabela 4).

Nas plantas da cultivar BRS Araçá não inoculadas e supridas com Si, ocorreram aumentos significativos em A aos 20 e 30 dai (Fig. 1A), e aumentos significativos aos 10 dai em A/C_i (Fig. 5A) quando comparadas as plantas do tratamento -Si. A E nas plantas não inoculadas supridas com Si apresentou reduções significativas aos 5 e 30 dai quando comparadas as plantas não inoculadas do tratamento +Si (Fig. 2A). A relação C_i/C_a nas plantas não inoculadas supridas com Si reduziu significativamente aos 0, 5 e 20 dai quando comparadas as plantas não inoculadas do tratamento +Si (Fig. 4A).

Nas plantas da cultivar BRS Araçá inoculadas supridas com Si ocorreram aumentos significativos em A aos 5, 10 e 30 dai (Fig. 1B); aumentos significativos aos 20 dai na g_s (Fig. 3B); e aumentos significativos aos 10 e 30 dai na A/C_i (Fig. 5B) quando comparadas as plantas inoculadas que não receberam Si. Nas plantas inoculadas supridas com Si reduziu-se significativamente a E aos 10 e 30 dai quando comparadas as plantas não inoculadas do tratamento +Si (Fig. 2B). Nas plantas da cultivar BRS Araçá inoculadas supridas com Si a C_i/C_a reduziu significativamente aos 20 e 30 dai quando comparadas as plantas não inoculadas do tratamento +Si (Fig. 4B).

As plantas não inoculadas supridas com Si da cultivar FM 993 apresentaram aumentos significativos em A aos 10, 20 e 30 dai (Fig. 1C); aumentos significativos aos 5 e 10 dai na g_s (Fig. 3C) quando comparadas com as plantas não inoculadas do tratamento -Si. A E nas plantas não inoculadas supridas com Si reduziu significativamente aos 5 e 10 dai, quando comparadas com as plantas inoculadas do tratamento +Si (Fig. 2C).

As plantas inoculadas supridas com Si da cultivar FM 993 apresentaram aumentos significativos na A aos 10 e 30 dai (Fig. 1D); aumentos significativos aos 20 dai na g_s (Fig. 3D); aumentos significativos aos 10 e 30 dai em A/C_i (Fig. 5D), quando comparadas as plantas inoculadas e que não receberam Si. Nas plantas inoculadas que receberam Si a E reduziu significativamente aos 10 e 30 dai, quando comparadas com as plantas do tratamento +Si (Fig. 2D). Nas plantas inoculadas supridas com Si a C_i/C_a reduziu significativamente aos 10, 20 e 30 dai, quando comparadas as plantas inoculadas do tratamento -Si (Fig. 4D).

3.3 Concentração de pigmentos

Houve efeito significativo do fator cultivares para a variável concentração de cl_a (Tabela 2). Houve efeito significativo do fator inoculação para a variáveis concentração de cl_b (Tabela 2). Houve efeito do fator doses de Si para as variáveis concentração de cl_a , concentração de carotenóides e razão entre as concentrações de cl_{a+b} /carotenóides (Tabela 2).

As plantas da cultivar BRS Araçá inoculadas do tratamento +Si apresentaram aumentos significativos aos 30 dai na concentração de cl_a (Fig. 6B); aumentos significativos aos 20 dai para a concentração de cl_b (Fig. 7B) e aumentos significativos

aos 30 dai para a razão entre concentrações de cl_{a+b} /carotenóides (Fig. 9B) quando comparadas as plantas inoculadas do tratamento -Si.

Nas plantas da cultivar FM 993 inoculadas do tratamento +Si houveram aumentos significativos na concentração de cl_a aos 20 e 30 dai (Fig. 6D); aumentou significativamente a concentração de cl_b aos 10 e 20 dai (Fig. 7D); aumentou significativamente a concentração de carotenóides aos 10 e 30 dai (Fig. 8D), quando comparadas as plantas inoculadas do tratamento -Si.

3.4 Razões alométricas

Houve efeito significativo do fator cultivares para as variáveis RMF, RMC, RMR, AFE e RAF (Tabela 6). Foi constatado efeito significativo do fator inoculação para as variáveis MST, RMF, RMC, RMR e RAF (Tabela 6). Houve efeito significativo do fator doses de Si para as variáveis MST, RMF, RMP, AFE e RAF (Tabela 6). A interação entre os fatores cultivares \times inoculação foi significativa para as variáveis MST e RMR (Tabelas 6 e 7).

3.5 Correlação de Pearson

Houve correlação negativa significativa entre o IR e as variáveis A , g_s , E , A/C_i e MST nas plantas supridas com Si. Correlação positiva significativa entre o IR e C_i/C_a nas plantas supridas com Si (Tabela 5). Observou-se também correlações positiva significativa entre as variáveis A e g_s , entre as variáveis A e MST, e entre as variáveis g_s e E (Tabela 5).

4. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que todas as variáveis das trocas gasosas nas duas cultivares foram afetados negativamente após a inoculação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sendo confirmado através da AACIR. Os efeitos prejudiciais da infecção foram mais intensos a partir dos 10 dai, período posterior à incubação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, ou seja, o tempo gasto entre a inoculação e a aparência dos primeiros sintomas da doença (Xavier et al., 2001). Com isso, é possível propor que a extensão do IR pode ser um bom indicador do potencial de impacto da doença sobre a assimilação de CO_2 , podendo ser confirmado a partir das

correlações obtidas entre IR e as variáveis fotossintéticas avaliadas. Na maioria das doenças foliares, a A é reduzida a partir do início da infecção (Berger et al., 2007) e uma menor g_s é uma das principais restrições para a fotossíntese nas plantas doentes. A redução na g_s limita o influxo de CO₂ às folhas (Dallagnol et al., 2011). Nas folhas de plantas infectadas por diferentes patógenos, observa-se, geralmente, ocorre uma redução no transporte de elétrons da cadeia fotossintética, indicando decréscimo na eficiência do uso da luz e, conseqüentemente, um aumento no excesso de energia de excitação. Essa energia em excesso pode estar associada com o decréscimo na g_s criando, assim, condições para elevar a produção de EROs que prejudicam a homeostase celular (Mateo et al., 2004).

A redução na A observada nas plantas que não receberam Si está relacionada tanto a limitação estomática, quanto a limitações relacionadas à fixação de carbono a nível de cloroplasto, indicando danos ao aparelho fotossintético. É possível que a atividade das enzimas envolvidas na fixação do CO₂ tenha sido afetada, pois foram constatados elevados valores de C_i/C_a . A redução na transpiração nas plantas doentes pode está relacionada com a destruição da cutícula, dos estômatos e rompimento do limbo foliar, conduzindo diretamente a reduções na g_s , já que nessas plantas a AACIR foi maior quando comparadas com as plantas supridas com Si. Estes resultados corroboram com os de Bastiaans (1993) mostra que a infecção por *Magnaporthe grisea*, em arroz, reduziu a fotossíntese e o tecido verde da folha ao redor das lesões devido a uma menor área foliar verde. Em folhas de trigo infectadas por *Puccinia coronata*, a fotossíntese foi severamente inibida, indicando que o aparelho fotossintético foi severamente danificado (Scholes & Rolfe, 1996). Laranjeiras infectadas por *Xylella fastidiosa* mostraram diminuição na assimilação de CO₂ causada pela baixa g_s , bem como por limitações bioquímicas à maquinaria fotossintética (Ribeiro et al., 2003). Resultados semelhantes foram relatados para plantas de *E. globulus* infectadas por *Mycosphaerella* sp., onde as reduções de A não estavam relacionados ao aumento da resistência estomática, mas sim à redução da atividade da ribulose-bisfosfato (RuBP) carboxilase/oxigenase (Rubisco) e alterações na capacidade de regeneração da RuBP (Pinkard & Mohammed, 2006). Pode-se inferir que as reduções em A provocadas pela infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro estão relacionadas a limitações no influxo de CO₂ nas folhas, mas também com limitações bioquímicas para a fixação de CO₂ a nível de cloroplasto.

A colonização dos tecidos foliares pelo patógeno reduziu a concentração dos pigmentos nas folhas das duas cultivares de algodoeiro, especialmente as concentrações de cl_a , cl_b e carotenóides. No patossistema arroz-*B. oryzae* a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno em estágios mais avançados da infecção reduziram as concentrações de cl_a , e cl_b , porém os carotenóides foram menos prejudicados (Dallagnol et al., 2011). No patossistema milho-*Exserohilum turcicum*, cl_a foi mais afetada do que cl_b pelas toxinas secretadas pelo fungo (Chauhan et al., 1997). Os resultados obtidos corroboram com os encontrados pelos autores citados. O fechamento estomático, devido à redução na g_s , interfere a cadeia de transferência de elétrons e reduz a entrada de CO_2 nos cloroplastos durante o ciclo de Calvin, com isso haverá excesso de NADPH e os elétrons originários da quebra da molécula de água na fotossistema II não terão disponível $NADP^+$ para reduzi-lo, levando a um forte aumento na quantidade de elétrons, que por sua vez, provocarão foto-oxidação da clorofila nas antenas do fotossistema (Bacelar et al., 2006).

A infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nas plantas das duas cultivares levou a reduções nas quantidades de MST, RMF, RMC, RMR, AFE e RAF. Possivelmente essas reduções são devido à infecção ocasionada pelo patógeno *C. gossypii* var. *cephalosporioides* provocando reduções nas taxas fotossintéticas e consequentemente menor acúmulo de matéria seca. Além disso, é muito provável que as reduções na RMF, RMR, AFE e RAF sofridas pela cultivar FM 993 ocorreram em virtude da maior incidência da ramulose, afetando mais intensamente o crescimento das plantas.

Os maiores valores de A nas plantas não inoculadas e inoculadas supridas com Si pode está relacionada à maior condutância estomática, permitindo maior influxo de CO_2 . Oliveira & Castro (2002) mostraram que a deposição de Si nos tricomas e estômatos de *Curatella amaricana* proporcionou maior abertura estomática. Possivelmente o acúmulo de Si nessa região permitiu a manutenção da abertura estomática e maior influxo de CO_2 mesmo após a infecção. Os danos no aparato fotossintético devido à infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são inevitáveis e são responsáveis pelos baixos valores de A. É possível que o fornecimento de Si tenha alguma relação com aumento na A, pois Fauteux et al. (2006) demonstraram que na presença do Si houve aumento na expressão de genes relacionados com a fotossíntese e algumas vias energéticas em plantas de *Arabidopsis* infectadas por *Erysiphe*

cichoracearum. Possivelmente os aumentos na A obtidos neste estudo podem apresentar alguma relação com os dados destes autores.

As plantas que receberam Si apresentaram menores valores de E , conseqüentemente, houve uma menor perda de vapor d'água em relação às plantas não supridas com esse elemento. Estudos tem mostrado que a transpiração das folhas de algumas plantas é reduzida consideravelmente pela aplicação de Si (Agarie et al., 1998). O acúmulo de Si proporciona uma proteção mecânica à epiderme, que aumenta a resistência à seca, e o Si acumulado nas lâminas foliares forma uma dupla camada de sílica-celulose que confere diminuição da permeabilidade do vapor de água, o que limita a perda de água através da cutícula, reduzindo a transpiração cuticular (Ma et al., 2001; Yoshida et al., 1962). Agarie et al. (1998) encontram menor taxa de transpiração em plantas de arroz que cresceram em meio que havia Si. Hattori et al. (2005) observaram maior taxa de transpiração, condutância estomática e acúmulo de matéria seca em plantas de sorgo submetidas a déficit hídrico e supridas com Si, em relação as plantas não supridas. É possível que o fornecimento de Si tenha colaborado para aumentar a resistência das duas cultivares, reduzindo os danos ocasionados pela ramulose e simultaneamente aumentando as taxas fotossintéticas e o acúmulo de MST. Os resultados ora obtidos corroboram com outros encontrados por Chen et al. (2011) que obtiveram reduções na E e C_i , aumentos em g_s , A e acúmulo de matéria seca em plantas de arroz supridas com Si sob condições de estresse hídrico.

A infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* reduziu significativamente as concentrações de cl_a , cl_b e carotenóides, mas nas plantas que receberam Si essas concentrações foram maiores. Pode-se dizer que o Si afetou as concentrações de pigmentos possivelmente devido ao seu efeito atuando como barreira física impedindo a penetração das hifas do patógeno, o que reduziu os índices de infecção, comprovados pelas menores AACIR. Chen et al. (2011) mostraram aumentos nas concentrações de clorofilas em plantas de arroz, sob estresse hídrico, isso pode ter alguma relação com a maior eficiência fotoquímica das plantas. Adatia & Besford (1986) relatam que a aplicação de Si aumentou a concentração de pigmentos e a atividade da rubisco em plantas de pepino. Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o Si pode está exercendo influência positiva sobre a capacidade fotossintética das plantas de algodoeiro.

A infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* afetou a fisiologia das plantas de algodoeiro alterando a sua capacidade fotossintética. O fornecimento de Si às plantas

de algodoeiro potencializou a A devido ao aumento na g_s e fixação de CO₂, além de redução na E. Com isso, pode-se sugerir que a manutenção da taxa fotossintética das plantas de algodoeiro durante o processo infeccioso contribuíram para a maior resistência à ramulose.

5. Referências

- Adatia, M. H., Besford, R. T. (1986). The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany*, 58, 343-351.
- Agarie, S., Uchida, H., Agata, W., Kubota, F., Kaufman, P. B. (1998). Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 1, 89-95.
- Alves, A. A., Guimarães, L. M. S., Chaves, A. R. M., DaMatta, F. M., Alfenas, A. C. (2011). Leaf gas Exchange and chlorophyll a fluorescence os *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiology Plant*, 33, 1831-1839.
- Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., Correia, C. M. (2006). Immediate responses and adptative strategies of three olive cultivars under constringing water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170, 596-605.
- Bastiaans, L. (1993). Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. Leaf photosynthesis. *Neth Journal Plant Pathology*, 99, 197-203.
- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4019-4026.
- Chen, W., Yao, X., Cai, K., Chen, J. (2011). Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. *Biological Trace Elements Residuos*, 142, 67-76.
- Chauhan, R. S., Singh, B. M., Develash, R. K. (1997). Effect of toxic compounds of *Exserohilum turcicum* on chlorophyll content, callus growth and cell viability of susceptible and resistant inbred lines of maize. *Journal Phytopathol*, 145, 435–440.
- Costa, A. S., Fraga Júnior, C. G. (1937). *Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro*. Campinas: Instituto Agrônômico, 1937. 23p. (Boletim Técnico, 19).

- Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. A., Martins, S. C. V., Cavatte, P. C., DaMatta, F. M. (2011). Alterations on Rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australian Plant Pathology*, 40, 360-365.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.
- Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J. G., Bélanger, R. R. (2006). The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Proceedings*, 103, 17554-17559.
- Feng, J., Shi, Q., Wang, X. (2009). Effects of exogenous silicon on photosynthetic capacity and antioxidant enzyme activities in chloroplast of cucumber seedlings under excess manganese. *Agricultural Sciences in China*, 8, 40-50.
- Gong, H., Chen, K., Chen, G., Wang, S., Zhang, C. (2003). Effects of silicon on the growth of wheat and its antioxidative enzymatic system. *Chinese Journal of Soil Science*, 34, 55-57.
- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E. G., Pilbeam, D. J. (2007). Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant and Soil*, 290, 103-114.
- Hattori, T., Inanaga, S., Araki, H., An, P., Morita, S., Luxova, M., Lux, A. (2005). Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum*, 123, 459-466.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Cal agric. Exp. Sta. Cir.* 32.
- Hodges, C. F., Campbell, D. A. (1999). Endogenous ethane and ethylene of *Poa pratensis* leaf blades and leaf chlorosis in response to biologically active products of *Bipolaris sorokiniana*. *European Journal Plant Pathology*, 105, 825-829.
- Hodson, M. J., Sungster, A. G. (2002). Silicon and abiotic stress. In: Matoh, T. (Ed.) *Second Silicon in Agriculture Conference* (pp. 99-104). Tokyo, Press-Net.
- Hunt, R. (1990). *Basic growth analysis*. (pp 112) London, Unwin Hyman, Academic Division of Unwin Hyman Ltd.
- Korndörfer, G. H., Pereira, H. S., Nolla, O. A. (2004). *Análise de silício: solo, planta e fertilizante*. (pp 34). Uberlândia, MG, Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia.
- Liang, Y. C., Zhang, W. H., Chen, Q., Liu, Y. L., Ding, R. X. (2006). Effect of exogenous silicon (Si) on H⁺-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma

- membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 57, 212-219.
- Lichtenthaler, H. K., Miehé, J. A. (1997). Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Science*, 2, 316-320.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce, R., Packer, L. (Eds) *Methods in enzymology*, (pp 350-382). New York, Academic.
- Ma, J. F. (2004). Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50, 11-18.
- Ma, J. F., Miyake, Y., Takahashi, E. (2001). Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff, L. E., Sneder, G. H., Korndörfer, G. H. (Eds.). *Silicon in Agriculture* (pp.17-39). Elsevier Science.
- Ma, J. F., Takahashi, E. (2002). Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. *Elsevier Science*.
- Marrur, C. J., Ruano, O. (2001). A reference system of determination of cotton plant development. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, 5, 313-317.
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C. C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J. E., Mullineaux, P. M., Karpinski, S. (2004). Lesion simulating disease is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology*, 136, 2818-2830.
- Matsuda, R., Ohashi-kaneko, K., Fujiwara, K., Goto, E., Kurata, K. (2004). Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiology*, 45, 1870-1874.
- McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195-218.
- Mehta, Y. R., Zandoná, C., Bibanco, K., Almeida, W. P., Teixeira, E. A., Cunha, H. C., Erivaldo, J. (2005). Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 31, 142-145.
- Oliveira, L. A., Castro, N. M. (2002). Ocorrência de sílica nas folhas de *Curatella americana* L. e de *Davilla elliptica* St. Hil. *Revista Horizonte Científico*, 4,1-16.
- Pinkard, E. A., Mohammed, C. L. (2006). Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytol*, 170,119–127.

- Ranganathan, S., Chandrasekhara Rao, C., Suvarchala, V., Rajesh, Y. B. R. D., Jagdesh, B. (2006). Solubilization of silica: synthesis, characterization and study of penta-coordinated pyridine N-oxide silicon complexes. *Journal Chemistry Science*, 116, 169-174.
- Ribeiro, R. V., Machado, E. C., Oliveira, R. F. (2003). Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 62, 167-173.
- Rodrigues, F. A., Benhamou, N., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Bélanger, R. R. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*, 93, 535-546.
- Suassuna, N. D., Coutinho, W. M. (2011). Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil* (pp 567-612). Brasília: Abrapa. 2011.
- Scholes, J., Rolfe, S. A. (1996). Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*, 199, 573-582.
- Shaner, G., Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67, 1051-1056.
- Xavier, A. A., Alfenas, A. C., Matsuoka, K., Hodges, C. S. (2001). Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Australas Plant Pathology*, 30, 277-281.
- Yoshida, S., Ohnishi, Y., Kitagishi, K. (1962). Chemical forms, mobility and deposition of silicon in rice plants. *Soil Science Plant Nutrition*, 8, 15-21.

Tabela 1. Área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) e concentração foliar de silício (Si) (g/kg) em plantas de algodão das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

		AACIR		Si (g/kg)	
Cultivares		BRS Araçá	FM 993	BRS Araçá	FM 993
Silício	-Si	1325 Ab	1900 Aa	0,70 Ba	0,90 Ba
	+Si	1050 Bb	1287 Ba	12,20 Aa	8,10 Ab
Valores de <i>F</i>					
		AACIR		Si	
Cultivares (C)		36,38**		3,96 ^{ns}	
Silício (Si)		43,41**		89,76**	
C × Si		6,25*		4,67*	
C.V. (%)		15,31		36,64	

** e * $P \leq 0,01$ e $0,05$: significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste-*F*

^{ns}: não significativo; C.V.: coeficiente de variação

Médias na coluna seguidas de mesmas letras maiúsculas ou médias na linha seguidas de letras minúsculas distintas, são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 2 - Análise de variância para as variáveis taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), razão entre concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), razão entre fotossíntese e concentração interna de CO_2 (A/C_i), concentração de clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b), carotenóides (Carot) e razão entre clorofilas a+b e carotenóides ($Cl_{a+b}/Carot$) em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício e inoculadas ou não com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Fontes de Variação	A	g_s	E	C_i/C_a	A/C_i	Cl_a	Cl_b	Carot	$Cl_{a+b}/Carot$	
Cultivares	BRS Araçá	23,21	0,32	3,91	0,55	0,101	44,24	16,36	10,71	5,70
	FM 993	22,42	0,31	4,22	0,55	0,090	47,32	15,73	10,82	5,96
	DMS	0,88 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,13*	0,02 ^{ns}	0,005 ^{ns}	2,34*	0,91 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,26 ^{ns}
Inoculação	Plantas Não Inoculadas	25,62	0,37	4,12	0,51	0,112	45,00	15,44	11,07	6,12
	Plantas Inoculadas	20,02	0,26	3,99	0,59	0,084	46,56	16,65	10,46	5,53
	DMS	0,88*	0,02*	0,13 ^{ns}	0,02*	0,005*	2,34 ^{ns}	0,91*	0,61 ^{ns}	0,26 ^{ns}
Silício	-Si	22,21	0,30	4,27	0,57	0,095	44,42	15,70	10,19	5,99
	+Si	23,43	0,34	3,84	0,53	0,102	47,14	16,38	11,35	5,67
	DMS	0,08*	0,02*	0,13*	0,02*	0,005*	2,34*	0,91 ^{ns}	0,61*	0,26*
Valores de F										
Blocos	0,20 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,36 ^{ns}	
Cultivares (C)	3,11 ^{ns}	0,51 ^{ns}	19,04**	0,01 ^{ns}	3,27 ^{ns}	6,81*	1,86 ^{ns}	0,14 ^{ns}	3,54 ^{ns}	
Inoculação (I)	156,40**	108,17**	3,75 ^{ns}	56,28**	111,52**	1,73 ^{ns}	6,83*	3,88 ^{ns}	19,25**	
Doses de Silício (Si)	7,44**	11,13**	39,95**	18,49**	6,82**	5,28*	2,18 ^{ns}	13,82*	6,03*	
C × I	0,61 ^{ns}	0,34 ^{ns}	9,40*	0,02 ^{ns}	0,57 ^{ns}	3,63 ^{ns}	3,51 ^{ns}	3,53 ^{ns}	0,01 ^{ns}	
C × Si	0,01 ^{ns}	0,09 ^{ns}	1,49 ^{ns}	3,94 ^{ns}	2,19 ^{ns}	0,93 ^{ns}	1,98 ^{ns}	16,16 ^{ns}	28,89 ^{ns}	
I × Si	0,47 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	13,83**	2,55 ^{ns}	2,36 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,02 ^{ns}	1,41 ^{ns}	
C × I × Si	0,32 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,54 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	
C.V. (%)	15,18	26,12	13,02	14,62	20,84	14,61	16,25	16,40	13,04	

** e * $P \leq 0,01$ e $0,05$: significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste-F

* $P \leq 0,05$: significativo a 5% de probabilidade pelo teste-t; ^{ns}: não significativo; C.V.: coeficiente de variação

Tabela 3. Transpiração (E) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em plantas das cultivares de algodoeiro BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva inoculadas ou não inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Inoculação	Plantas não Inoculadas	Plantas Inoculadas
Cultivares	BRS Araçá	3,74 Bb
	FM 993	4,25 Aa
		4,08 Aa
		4,17 Aa

Médias na mesma linha seguidas de letras maiúsculas diferentes ou médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 4. Razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) em folhas de plantas de algodoeiro crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas ou não com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Inoculação	Plantas não Inoculadas	Plantas Inoculadas
Silício	-Si	0,63 Aa
	+Si	0,51 Ab
		0,55 Ba
		0,51 Ab

Médias na mesma linha seguidas de letras maiúsculas diferentes ou médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 5. Valores de correlação de Pearson (acima da diagonal) e seus respectivos valores de probabilidades (abaixo da diagonal) entre as variáveis taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), razão entre concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), razão entre fotossíntese e concentração interna de CO_2 (A/C_i), matéria seca total (MST) e índice da ramulose (IR) avaliadas em plantas de algodão supridas com silício após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Variáveis	A	g_s	E	C_i/C_a	A/C_i	MST	IR
A	-	0,6588	0,4211	-0,1816	0,6980	0,5460	-0,8268
g_s	0,0001***	-	0,3140	-0,2616	0,5433	0,5408	-0,7044
E	0,0001***	0,0005**	-	0,9812	0,2856	0,4329	-0,4622
C_i/C_a	0,040*	0,003**	0,002**	-	-0,6779	-0,6837	0,2208
A/C_i	0,0001***	0,0001***	0,0016**	0,0001***	-	-0,4400	-0,6495
MST	0,0001***	0,0001***	0,0001***	0,040*	0,0001***	-	-0,5863
IR	0,0001***	0,0001***	0,0001***	0,0010**	0,0001***	0,0001***	-

*** e * $P \leq 0,0001$ e $0,05$: significativo a $0,01\%$ e 5% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 6. Análise de variância para as variáveis matéria seca total [MST (g)], razão de massa foliar (RMF), razão de massa caulinar (RMC), razão de massa do pecíolo (RMP), razão de massa radicular (RMR), área foliar específica [AFE ($m^2 kg^{-1}$)] e razão de área foliar [RAF ($m^2 kg^{-1}$)] obtidas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e avaliadas aos 30 dias após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Fontes de Variação		MST	RMF	RMC	RMP	RMR	AFE	RAF
Cultivares	BRS Araçá	7,31	0,39	0,42	0,08	0,09	45,40	17,92
	FM 993	7,96	0,32	0,46	0,08	0,07	35,32	13,38
	DMS	1,21 ^{ns}	0,03*	0,02*	0,01 ^{ns}	0,01*	8,26*	3,67*
Inoculação	Plantas Não Inoculadas	10,52	0,37	0,47	0,09	0,09	43,24	17,48
	Plantas Inoculadas	4,75	0,32	0,43	0,09	0,07	39,48	13,83
	DMS	1,21*	0,03*	0,02*	0,01 ^{ns}	0,01*	8,26 ^{ns}	3,67*
Silício	-Si	6,95	0,32	0,44	0,09	0,08	38,66	12,24
	+Si	8,32	0,39	0,45	0,07	0,08	48,06	18,07
	DMS	1,21*	0,03*	0,02 ^{ns}	0,01*	0,01 ^{ns}	8,26*	3,67*
Valores de F								
Blocos		0,14 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,84 ^{ns}	2,77 ^{ns}	1,07 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,05 ^{ns}
Cultivares (C)		1,12 ^{ns}	15,89**	6,94**	2,07 ^{ns}	8,89**	3,74*	5,95*
Inoculação (I)		88,35**	0,99*	0,39**	2,12 ^{ns}	21,41**	0,8 ^{ns}	0,78*
Doses de Silício (Si)		4,94**	18,80**	7,11 ^{ns}	10,46**	0,33 ^{ns}	0,66**	2,31**
C × I		5,39*	7,02 ^{ns}	1,35 ^{ns}	5,30 ^{ns}	10,60**	7,31 ^{ns}	4,73 ^{ns}
C × Si		0,10 ^{ns}	7,64 ^{ns}	3,41 ^{ns}	5,21 ^{ns}	0,01 ^{ns}	4,86 ^{ns}	2,36 ^{ns}
I × Si		0,13 ^{ns}	10,33 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,78 ^{ns}	4,18 ^{ns}	3,61 ^{ns}	1,73 ^{ns}
C × I × Si		2,88 ^{ns}	1,93 ^{ns}	1,50 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,13 ^{ns}	4,01 ^{ns}	3,37 ^{ns}
C.V. (%)		35,54	29,04	19,28	30,56	28,59	43,89	35,15

** e * $P \leq 0,01$ e $0,05$: significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste-F

* $P \leq 0,05$: significativo a 5% de probabilidade pelo teste-t; ^{ns}: não significativo; C.V.: coeficiente de variação

Tabela 7. Matéria seca total (MST) (g) e Razão da massa radicular (RMR) das plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva e inoculadas ou não inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Inoculação		MST		RMR		
		Plantas Inoculadas	não Inoculadas	Plantas Inoculadas	não Inoculadas	Plantas Inoculadas
Cultivares	BRS Araçá	9,48 Ab		5,13 Ba	0,10 Aa	0,07 Ba
	FM 993	11,56 Aa		4,36 Ba	0,08 Ab	0,07 Ba

Médias na mesma linha seguidas de letras maiúsculas diferentes ou médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

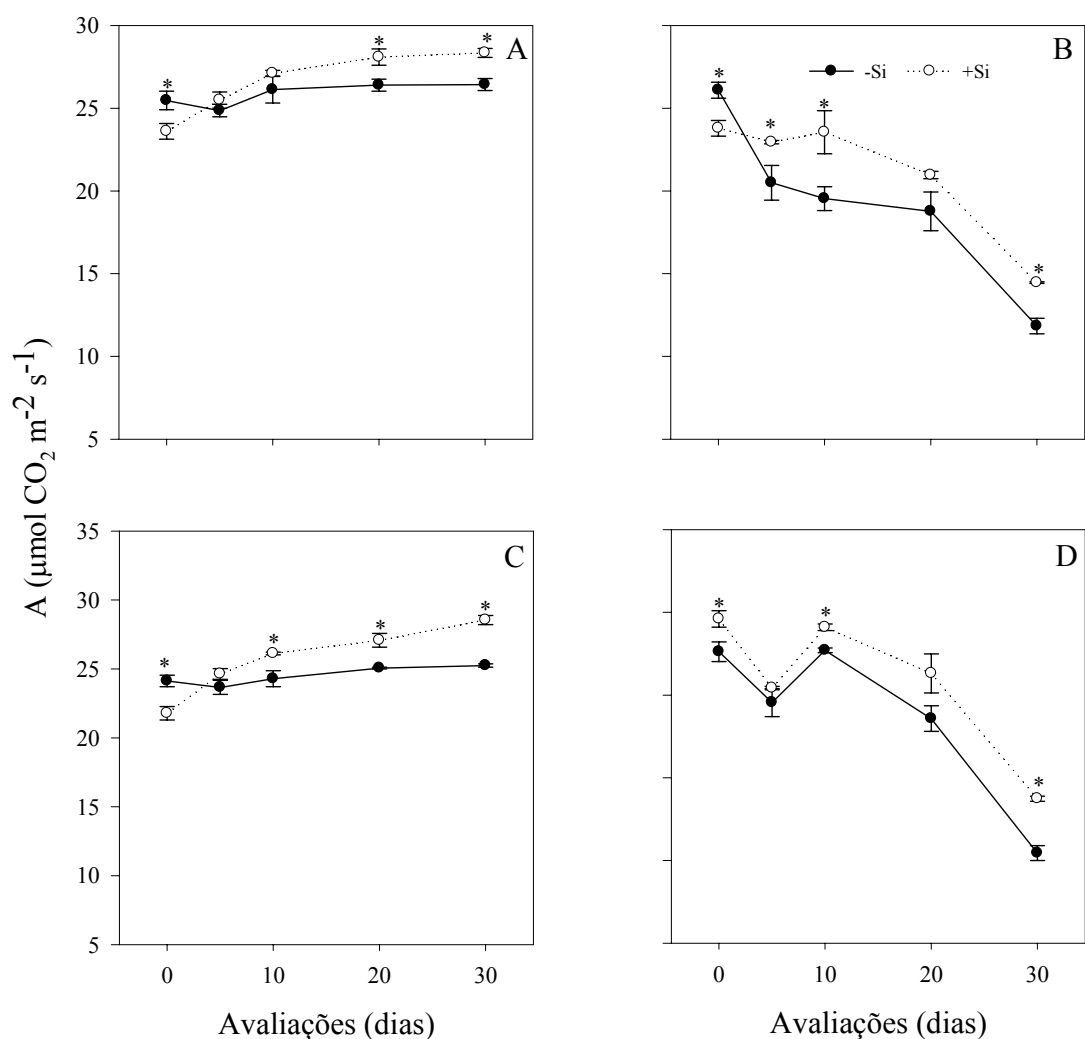


Figura 1. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A e B) e FM 993 (C e D) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

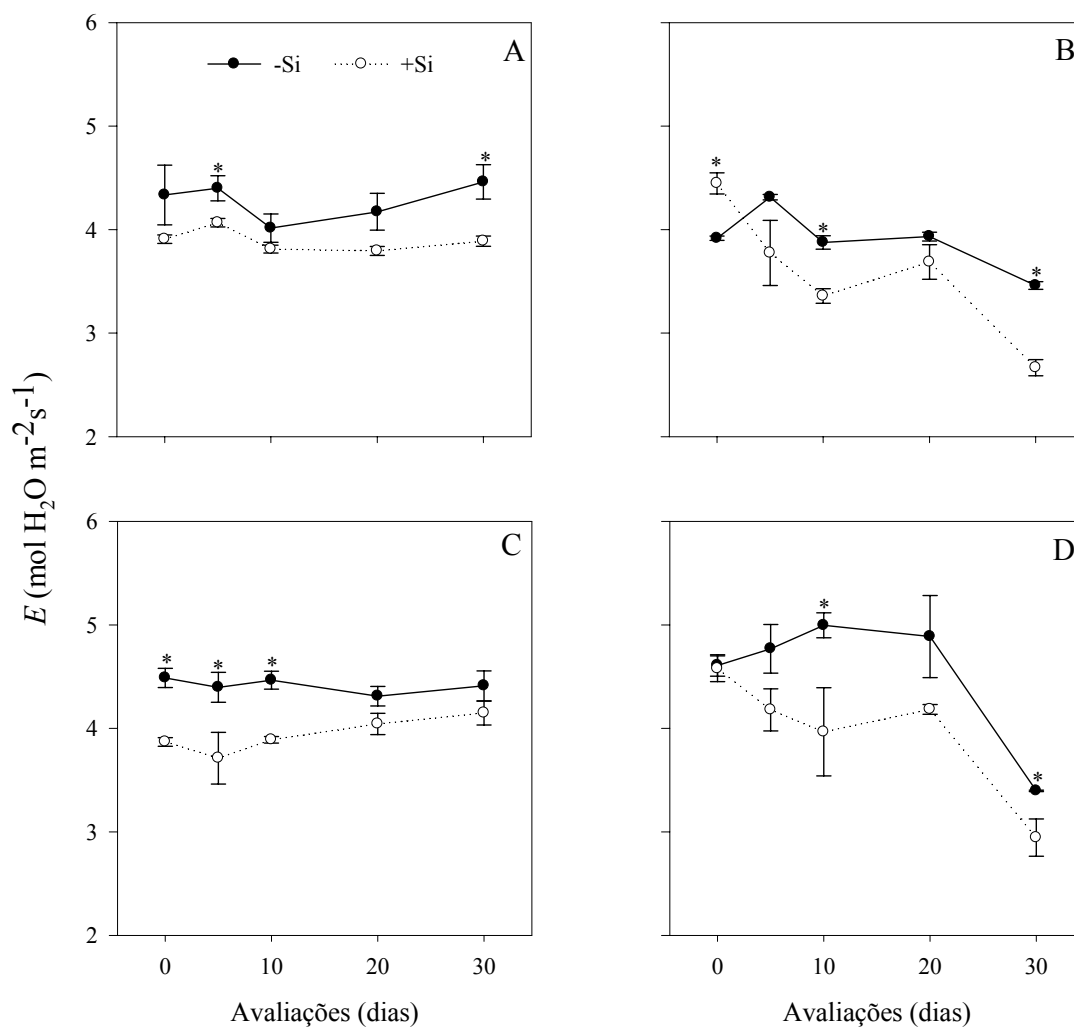


Figura 2. Taxa de transpiração (E) determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A e B) e FM 993 (C e D) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste- t a 5% de probabilidade.

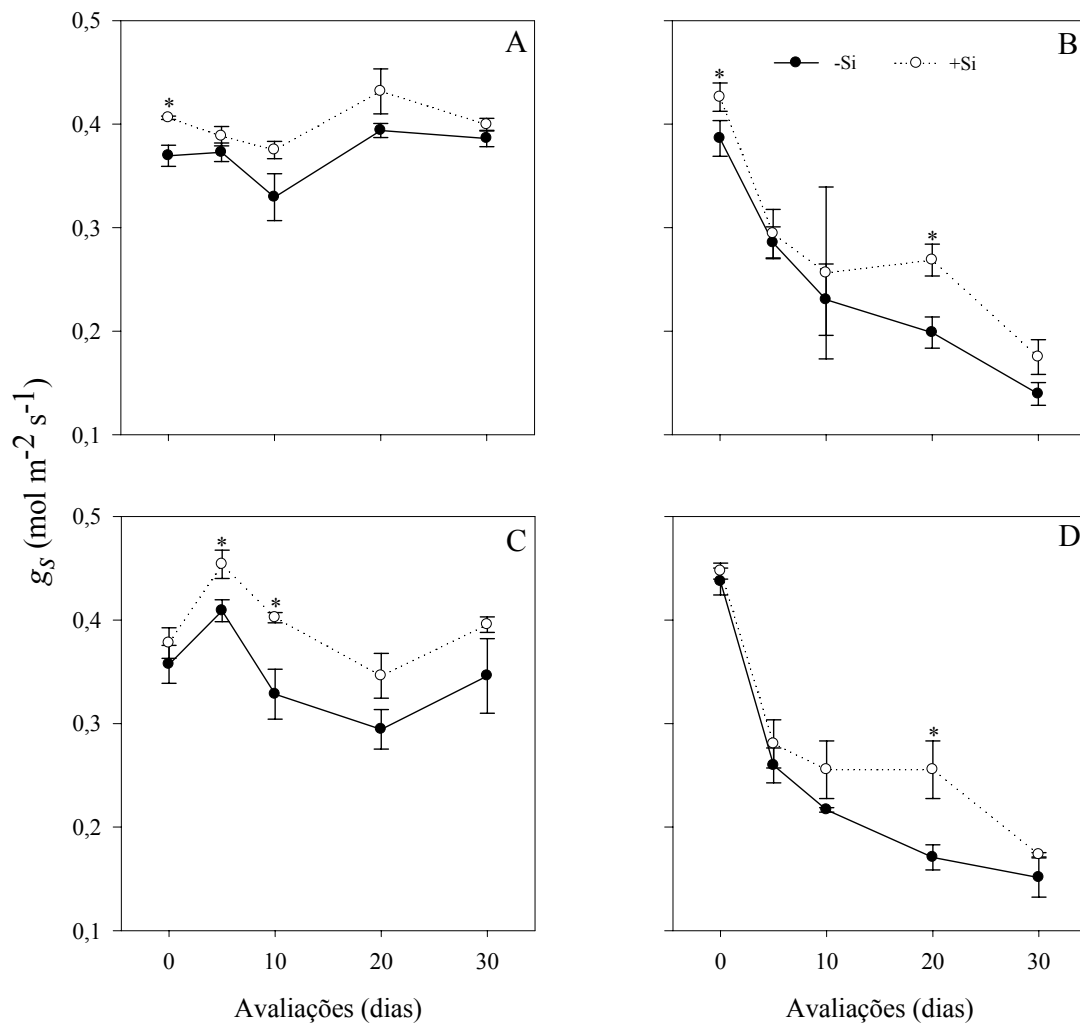


Figura 3. Condutância estomática (g_s) determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A e B) e FM 993 (C e D) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

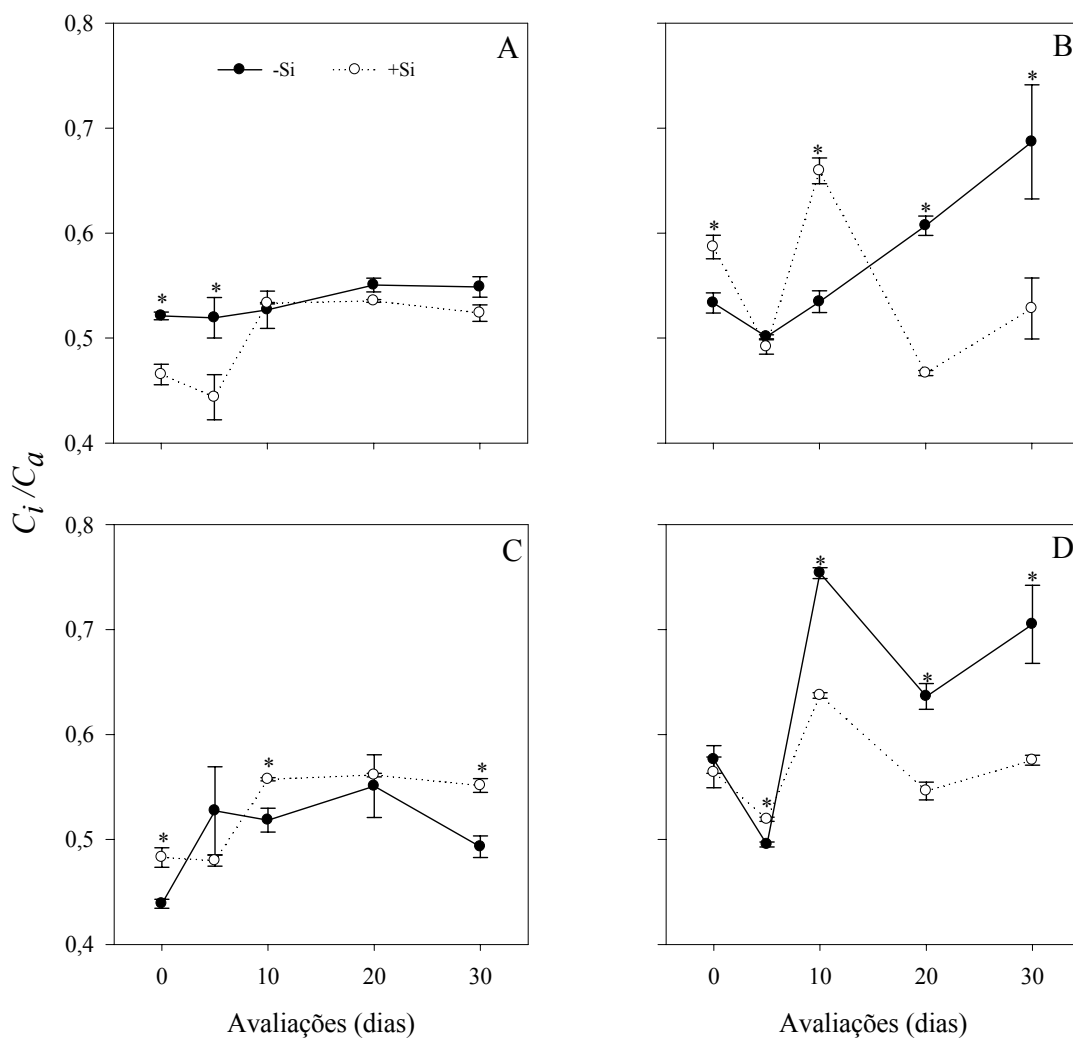


Figura 4. Razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A e B) e FM 993 (C e D) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

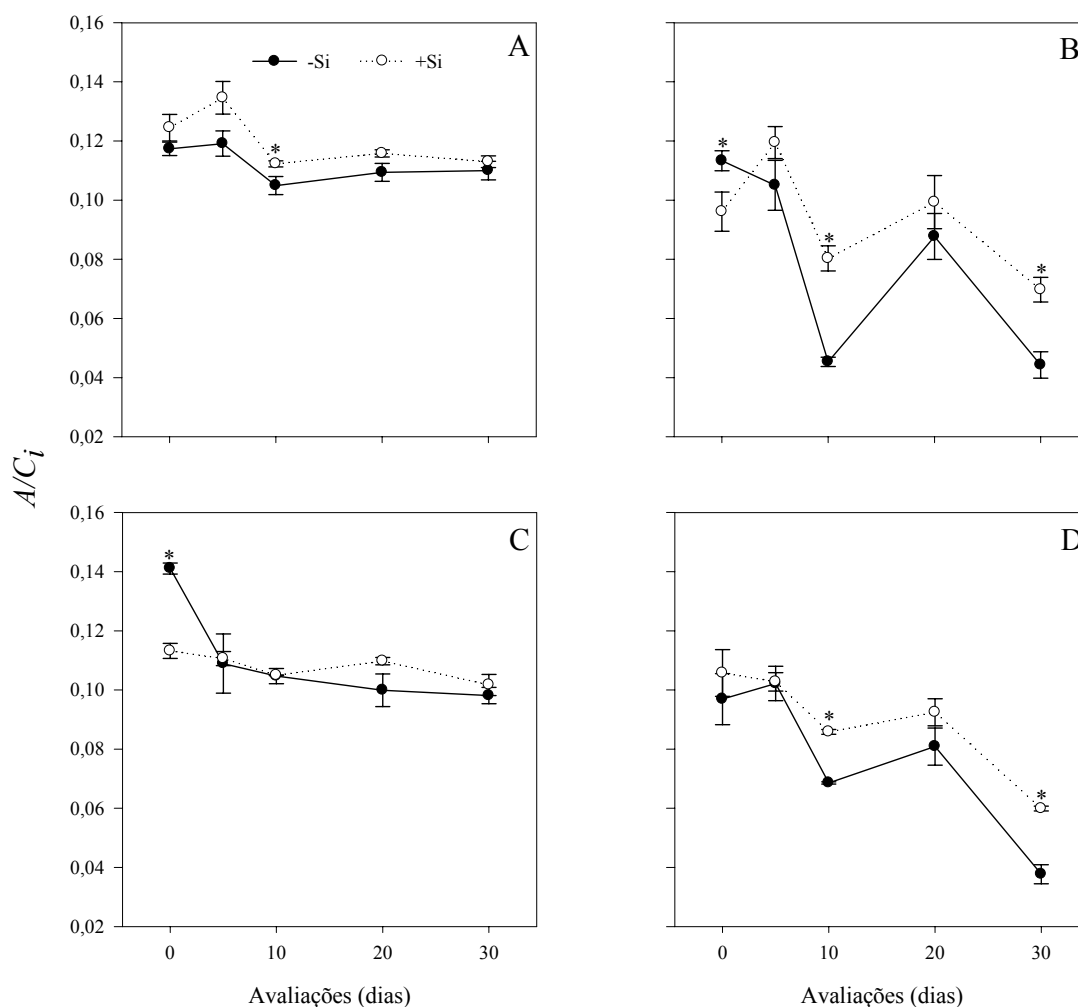


Figura 5. Razão entre a taxa de assimilação líquida de carbono e a concentração interna de CO_2 (A/C_i) determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A e B) e FM 993 (C e D) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de dez repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

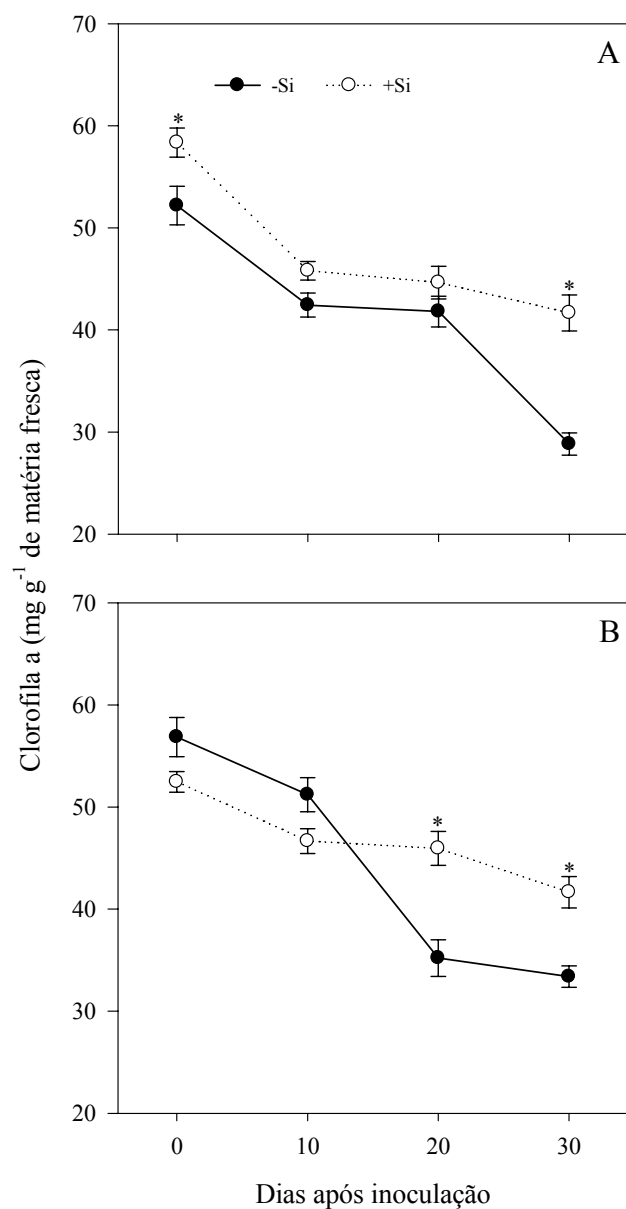


Figura 6. Concentração de Clorofila a determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

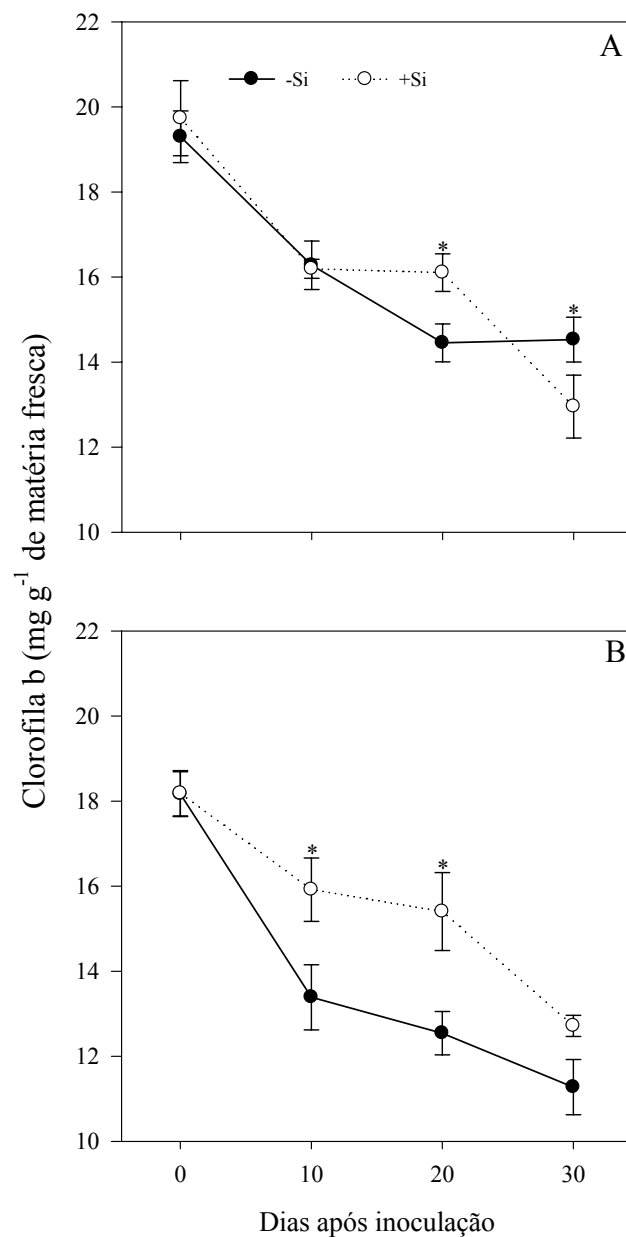


Figura 7. Concentração de Clorofila b determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

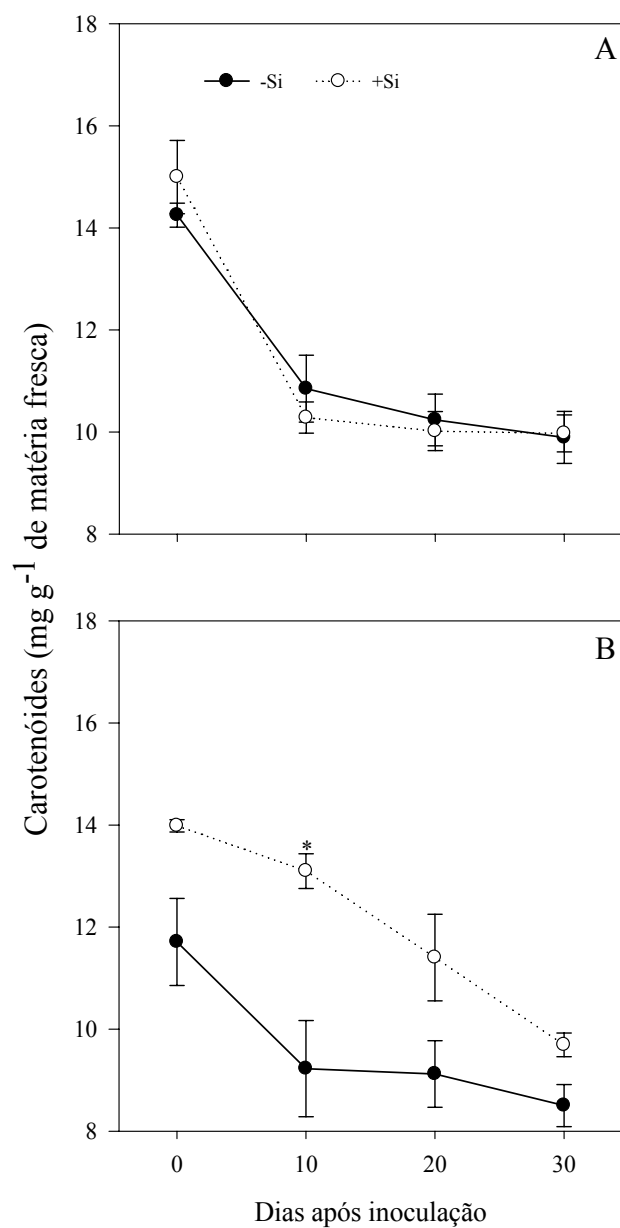


Figura 8. Concentração de carotenóides determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

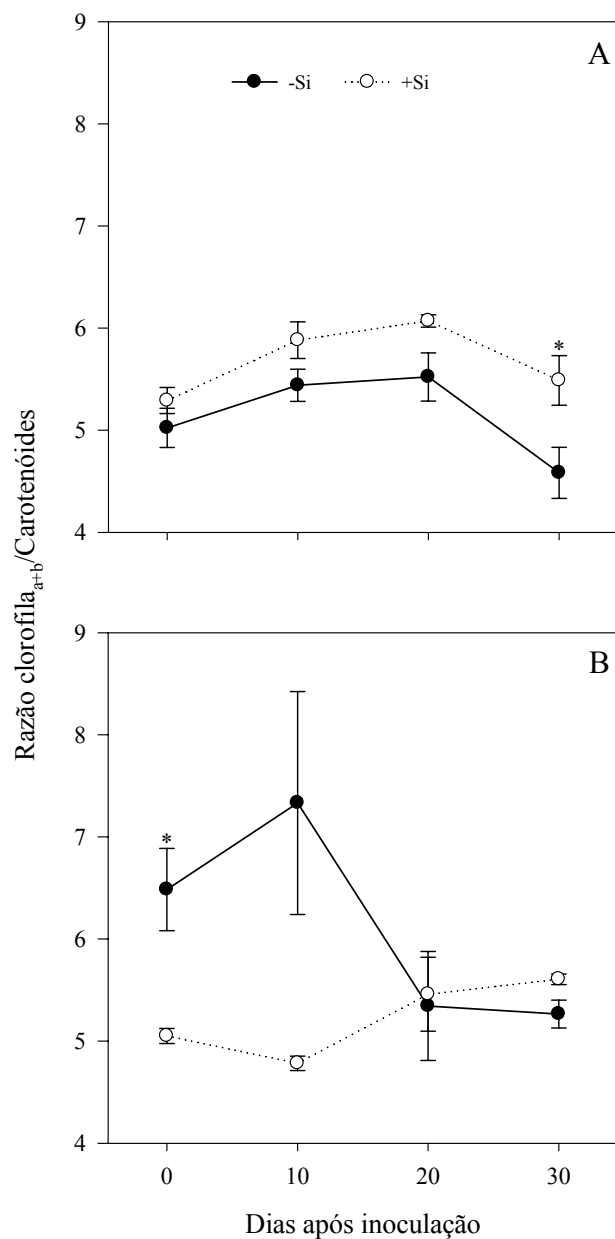


Figura 9. Razão entre clorofilas a+b/carotenóides determinada em folhas de plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) que foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias entre os tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 3

Metabolismo Antioxidante em Plantas de Algodoeiro Supridas com Silício e Infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Resumo

Plantas infectadas por patógenos normalmente produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) em maior quantidade, as quais devem ser rapidamente eliminadas para evitar-se danos oxidativos. O uso de silício (Si) tem reduzido a intensidade de várias doenças em culturas de importância econômica, além de estar envolvido na detoxificação das EROs em plantas submetidas aos estresses abiótico e biótico. Objetivou-se, com este estudo investigar o efeito do Si sobre o metabolismo antioxidante em plantas de algodoeiro infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Plantas de algodoeiro das cultivares BRS Araçá e Fiber Max 993 (FM 993) foram crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) Si. Avaliou-se a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutationa (GR) e lipoxigenase (LOX). As concentrações de aldeído malônico (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) e concentração foliar de Si também foram avaliados. A AACIR reduziu, e a concentração foliar de Si aumentou, nas plantas das duas cultivares supridas com Si. Houve aumento na atividade da SOD, CAT e APX. Houve redução da concentração de H₂O₂. Nas plantas da BRS Araçá essa redução foi atribuída a maior atividade da CAT, enquanto que na FM 993 à maior atividade da CAT e APX. A menor concentração MDA reduziu a peroxidação lipídica. Concluí-se que o Si afetou positivamente o metabolismo antioxidante de plantas de algodoeiro com aumento da resistência das plantas ao estresse oxidativo decorrente do processo infeccioso de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

1. Introdução

As doenças constituem uma das principais causas de grandes perdas na cultura do algodoeiro em todas as regiões produtoras no Brasil (Mehta et al., 2005). Dentre as doenças que afetam a cultura do algodoeiro, a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa, destaca-se por causar perdas de até 85% na produção (Suassuna & Coutinho, 2011). O fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* infecta as folhas, pecíolos e caule provocando nanismo e superbrotamento dos ramos, o que prejudica a formação das maçãs e, conseqüentemente, o rendimento do algodoeiro (Mehta et al., 2005). Os sintomas da doença podem levar a danos que prejudicam as membranas e o funcionamento da maquinaria enzimática das plantas (Bolton, 2009).

Plantas expostas a estresses bióticos e/ou abióticos normalmente produzem em maior extensão espécies reativas de oxigênio (EROs) incluindo o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio singleto (1O_2) (Apel & Hirt, 2004).

Se não houver uma rápida remoção das EROs do metabolismo, estes podem reagir com os ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, nas membranas das organelas e endomembranas, causando a peroxidação dos lipídeos, além de oxidar os pigmentos fotossintéticos, as proteínas e os ácidos nucleicos (Moller, 2001). A formação do aldeído malônico (MDA), um produto da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados, tem sido utilizada como um biomarcador da peroxidação lipídica (Mittler, 2002). A peroxidação lipídica também pode ser iniciada pelas lipoxigenases (LOX), as quais incorporam o oxigênio molecular aos ácidos graxos poli-insaturados para formar hidroperóxidos lipídicos (Axelrod et al., 1981).

As enzimas antioxidantes mais importantes envolvidas na detoxificação de EROs são as dismutases do superóxido (SOD), que catalizam a dismutação do O_2^- a H_2O_2 ; as catalases (CAT), que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Svalheim & Robertsen, 1993) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como as peroxidases do ascorbato (APXs) que reduzem o H_2O_2 utilizando o ascorbato como doador de elétrons (Yan et al., 1996). O ascorbato oxidado é, então, reduzido pela glutatona reduzida (GSH) oriunda da glutatona oxidada (GSSG), catalizada pela redutase da glutatona (GR) às expensas da NADPH (Yan et al., 1996).

Muitos estudos têm comprovado que as enzimas relacionadas com a defesa e antioxidantes como a peroxidase (POD) (Campos-Vargas & Saltveit, 2002), a SOD e a CAT (Svalheim & Robertsen, 1993), podem desempenhar papéis importantes nas

respostas de defesa das plantas quando infectadas por patógenos. As EROs são consideradas tóxicas aos patógenos, assim, as enzimas relacionadas com a detoxificação das EROS desempenham papel fundamental na modulação do nível delas na planta como respostas de defesa (Delledonne et al., 2001). De acordo com Paranidharan et al. (2003) e Zhang et al. (2006), a POD, a SOD e a CAT estão envolvidas na resposta de defesa do arroz a infecção por *R. solani*.

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na Terra, porém seu papel na biologia e fisiologia vegetal não foi claramente entendido (Epstein, 1999). Apesar de não ser considerado um elemento essencial para as plantas superiores (Epstein, 1999), muitos efeitos benéficos desse elemento têm sido demonstrados em várias espécies de plantas, especialmente sob condições de estresses bióticos (Adatia & Besford, 1986; Ma, 2004) ou abióticos (Ma & Yamaji, 2006; Ranganathan et al., 2006).

É relatado que o Si aumentou a atividade da SOD, POD, CAT e GR em folhas de plantas de cevada submetidas a estresse salino (Liang et al., 2003); o Si aumentou a atividade da SOD e APX em plantas de trigo crescendo sob condições de excesso de água (Gong et al., 2003); em plantas de pepino crescendo sob condições de estresse salino e supridas com Si, houve aumento na atividade da SOD, APX e GR (Zhu et al., 2004). Com relação a estresses bióticos, tem sido relatado que o Si influenciou mecanismos de defesa em pepino contra *Pythium* spp. pelo aumento da atividade de quitinases, peroxidases e polifenoloxidasas (Samuels et al., 1993). Raízes de pepino infectadas com *Phytophthora melonis* tiveram maior atividade da CAT e APX, além de uma correlação positiva entre as concentrações de Si e a atividade da CAT e APX nas plantas infectadas (Mohaghehg et al., 2011).

Assim, objetivou-se com o presente trabalho, investigar o efeito do Si sobre o metabolismo antioxidante das plantas de algodoeiro infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosprioides*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro

Sementes de algodão das cultivares BRS Araçá e Fiber Max 993 (FM 993) foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por 2 min, seguidas de lavagem em água destilada por 3 min e germinadas em leito de areia lavada e autoclavada. Dez dias após a germinação, cinco plântulas foram transferidas para vasos

plásticos contendo 5 L de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada e constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca(NO₃)₂; 0,3 μM CuSO₄.5H₂O; 1,3 μM ZnSO₄.7H₂O; 46 μM H₃BO₃; 12,6 μM MnCl₂.4H₂O; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 45 μM FeSO₄.7H₂O-EDTA bissódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410, Industrial Grade Strong Base Anion Exchanger) (Ma & Takahashi, 2002) foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) e 2 mM Si (+Si). Foi utilizada solução a meia força iônica incluindo a adição ou não do ácido monossilícico. Após 7 dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias e o pH foi verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0.

2.2 Obtenção do inóculo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e inoculação das plantas

As plantas de algodoeiro foram inoculadas com o isolado CNPA 0053 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* fornecido pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa do Algodão. O isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi armazenado em tubos de ensaio contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). O isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA e as placas foram transferidas para câmara de crescimento tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C onde permaneceram por até 15 dias até ocorrer abundante produção de conídios. O inóculo foi preparado adicionando-se 10 mL de água destilada em cada placa fazendo-se uma raspagem superficial com pincel de cerdas macias para liberação dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^6$ conídios/mL pela contagem em hemacitômetro. Para aumentar a aderência dos conídios sobre o tecido da planta, a suspensão foi preparada utilizando água contendo gelatina a 1% (p:v), além da adição de Tween 20 (0,1 mL/100 mL de suspensão) para quebrar e tensão superficial da água.

Plantas de algodoeiro no estágio V5 (40 dias após transplântio) (Marur & Ruano, 2001) foram inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando-se atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, USA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ com fluxo contínuo de luz por 24 h e, em seguida,

transferidas para câmara de crescimento com temperatura entre 25 e 35 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$ onde permaneceram até o final das avaliações.

2.3 Avaliação da severidade

A severidade da ramulose foi avaliada utilizando a escala de notas proposta por Costa & Fraga Júnior (1937) em que: 0 = plantas sem sintomas; 1 = plantas apresentando lesões necróticas nas folhas, pecíolos e nervuras; 2 = morte do ápice, hiperplasia e morte dos meristemas laterais; 3 = encurtamento dos internódios e início do superbrotamento e 4 = intenso superbrotamento e redução do porte e desenvolvimento da planta, morte das partes afetadas. A severidade foi avaliada aos 10, 20 e 30 dias após inoculação (dai). As notas de severidade foram usadas para calcular o índice da ramulose (IR) de acordo com o índice de Mckinney (1923) em que: $IR = [(nota\ da\ doença \times número\ de\ plantas\ com\ essa\ nota) / (número\ total\ de\ plantas \times nota\ máxima\ da\ doença\ na\ escala)] \times 100$. Os valores do IR para as repetições de cada tratamento foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

2.4 Determinação da concentração foliar de Si

Aos 30 dai, as folhas das plantas das repetições dos tratamentos foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70 °C até atingir peso constante. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 20 mesh (0,84 mm), para determinação da concentração foliar de Si conforme proposto por Korndörfer et al. (2004).

2.5 Coleta de amostras para determinação da atividade enzimática

Amostras da terceira, quarta e quinta folha do ápice para a base das plantas de cada repetição, foram coletadas aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação (dai). Amostras de folhas coletadas de plantas não inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (0 h) serviram como controle. As amostras coletadas rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

2.6 Determinação da atividade das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo

Foram determinadas as atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e da redutase da glutathiona (GR, EC 1.8.1.7). O extrato enzimático foi obtido de acordo com método de Havir et al. (1987), com algumas modificações. Foram macerados 0,2 g de tecido foliar em N₂ líquido seguido de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), DTT 2mM, polivinilpolipirrolidona (PVPP) (2%, p/v), 0,1% de Triton-X 10% e EDTA 2mM. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado nas determinações enzimáticas e para determinar a concentração de proteínas (Bradford, 1976).

2.6.1 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada medindo a capacidade dessa enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977). Cada 200 mL do meio de reação foi composto por 100 mL de tampão fosfato de potássio 105 mM (pH 7,8); 10,4 mL de metionina 13 mM; 15 mL de NBT 75 µM; 200 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM e 4 mL de riboflavina 2 µM. Foram utilizados 950 µL de meio de reação e 50 µL do extrato enzimático. A reação ocorreu em câmara com luz fluorescente de 15 W por 10 min. Após esse período, a produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT, foi monitorada pelo incremento na absorbância a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT. A atividade da SOD foi expressa em Unidades (Un) por mg⁻¹ de proteína min⁻¹.

2.6.2 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi estimada pela taxa de decomposição do H₂O₂ a 240 nm (Havir & McHale, 1987). Cada 1 mL do meio de reação foi composto por 167 µL do

tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0); 125 µL de H₂O₂ (12,5 mM), 693 µL de água e 15 µL do extrato enzimático. O meio de reação foi aquecido a 30 °C, adicionando-se o extrato enzimático para realização da leitura durante 2 min, observando-se o decréscimo na concentração de H₂O₂ na absorbância a 240 nm. A atividade da CAT foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.6.3 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada pela redução na absorbância a 290 nm (Nakano & Asada, 1981). Cada 1 mL do meio de reação foi composto por 200 µL de tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0); 40 µL de H₂O₂ 0,1 mM, 10 µL de ascorbato 50 mM, 710 µL de água e 45 µL do extrato enzimático. O meio de reação foi aquecido a 25 °C adicionando-se o extrato enzimático para realização da leitura durante 2 min, observando-se o decréscimo na concentração de ascorbato a 290 nm. A atividade da APX foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.6.4 Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

A atividade da GR foi avaliada por meio da taxa de oxidação da NADPH e NADH a 340 nm, por 2 min, em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Cada 1 mL do meio de reação foi composto por 180 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5); 515 µL de água; 200 µL de glutatona oxidada CSSG 10 mM; 40 µL de MgCl₂ 3 mM; 50 µL de NADPH 0,15 mM e 15 µL de extrato enzimático (Pinheiro et al., 2004). A atividade da GR foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.7 Determinação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a obtenção do extrato, foram macerados 0,2 g de tecido foliar em N₂ líquido para a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) contendo hidroxilamina (1 mM). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinar a concentração de H₂O₂ (Kuo & Kao, 2003). Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação constituído de: FeNH₄(SO₄) 100 µL,

ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100mM em volume final de 2 mL (Gay & Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com soluções de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em mmol de H_2O_2 g^{-1} de matéria fresca (Gay & Gebicki, 2000).

2.8 Determinação do aldeído malônico (MDA)

Foram macerados 0,2 g de tecido foliar em N_2 líquido seguido de homogeneização em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1%, p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e utilizado nas determinações das concentrações de MDA. Foram adicionados 500 μL do sobrenadante em um tubo plástico com tampa contendo 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,5%) em TCA 20%. As amostras foram incubadas por 2 h a 90 °C em banho-maria. A reação foi parada em banho de gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 4 min. A absorbância da mistura da reação foi determinada a 532 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Utilizou-se para os cálculos, o coeficiente de absorvidade molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em nmol g^{-1} de material vegetal fresco (Cakmak & Host, 1991).

2.9 Determinação da atividade de lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12)

Foram macerados 0,2 g de tecido foliar em N_2 líquido seguido de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), ditioneitol (DTT) 1 mg/mL de tampão, polivinilpirrolidona (PVP) (2%, p/v) e 0,25% Tween 20. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. A atividade da LOX foi determinada de acordo com Axelrod et al. (1981) mensurando o aumento da absorbância a 234 nm resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. O meio de reação foi constituído de 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), 100 μL da solução estoque de linoleato de sódio 10 mM e 15 μL do extrato vegetal. A absorbância da mistura da reação foi

determinada de 10 em 10 s a 234 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) por um período de 2 min. Utilizou-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 25.000 M cm⁻¹ e os resultados foram expressos em μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

2.10 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 × 2. Os fatores estudados foram duas cultivares de algodoeiro e duas doses de Si. Utilizaram-se seis repetições para avaliação de severidade e análise foliar de Si e para atividade enzimática foram utilizadas apenas quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo cinco plantas. Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo test-*t* ($P \leq 0,05$), a interação cultivares × doses de Si foi comparada pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

3. Resultados

3.1 Índice da ramulose e concentração foliar de Si

Os valores do índice da ramulose nas plantas de algodoeiro das duas cultivares supridas com Si foram menores em relação aos obtidos para as plantas das duas cultivares não supridas com esse elemento (Tabela 1). Houve interação significativa entre os fatores cultivares × doses de Si para a AACIR (Tabela 1). Houve interação significativa entre os fatores cultivares × doses de Si para a concentração foliar de Si (Tabela 1).

3.2 Atividades das enzimas do metabolismo anti-oxidativo

Houve efeito significativo do fator cultivares para a atividade das enzimas SOD e GR, e efeito significativo do fator Si para a atividade da enzima APX (Tabela 2).

A atividade da SOD nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, aumentou até os 30 dai (Fig. 1A); observou-se aumento significativo na atividade da SOD aos 0 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 1A).

Nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, a atividade da CAT aumentou até os 20 dai, seguida de decréscimo aos 30 dai (Fig. 2A); observou-se aumento significativo na atividade da CAT aos 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 2A).

Nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, a atividade da APX aumentou até os 30 dai (Fig. 3A).

A atividade da GR nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, apresentou aumento até os 20 dai e, posteriormente, permaneceu constante até os 30 dai (Fig. 4A); observou-se aumento significativo na atividade da GR aos 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 4A).

A concentração de H₂O₂ nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, decresceu até os 10 dai, e manteve-se estável até os 30 dai (Fig. 5A); observou-se aumento significativo concentração de H₂O₂ aos 10 e 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 5A).

A atividade da SOD nas plantas da FM 993 suprida com Si decresceu até os 20 dai, e aumentou até os 30 dai (Fig. 1B); observou-se aumento significativo na atividade da SOD aos 10 e 30 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 1B).

Nas plantas da FM 993 suprida com Si, a atividade da CAT aumentou até os 10 dai, permaneceu estável entre 10 e 20 dai, e aumentou novamente até os 30 dai (Fig. 2B); observou-se aumento significativo na atividade da CAT aos 10, 20 e 30 nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 2B).

A atividade da APX nas plantas da FM 993 suprida com Si, decresceu até os 20 dai, e aumentou até os 30 dai (Fig. 3B); observou-se aumento significativo na atividade da APX aos 0 e 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 3B).

A atividade da GR nas plantas da FM 993 suprida com Si aumento até os 30 dai (Fig. 4B); observou-se aumento significativo na atividade da GR aos 30 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 4B).

A concentração de H₂O₂ nas plantas da FM 993 supridas com Si aumentou até os 10 dai, e decréscimo até os 30 dai (Fig. 5B); observou-se aumento significativo aos

0, 10 e 30 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 5B).

Houve efeito significativo do fator cultivares para a atividade da enzima LOX e efeito significativo do fator Si para a atividade da LOX e concentração de MDA (Tabela 2).

A concentração de MDA nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, decresceu até os 10 dai, e aumentou até os 30 dai (Fig. 6A); observou-se aumento significativo concentração de MDA aos 30 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 6A).

A atividade da LOX nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, decresceu até os 10 dai, e então aumentou até os 20 dai, seguida de declínio até os 30 dai (Fig. 7A); observou-se aumento significativo na atividade da LOX aos 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 7A).

A concentração de MDA nas plantas da FM 993 suprida com Si, decresceu até os 20 dai, e aumentou até os 30 dai (Fig. 6B); observou-se aumento significativo concentração de MDA aos 0 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 6B).

A atividade da LOX nas plantas da FM 993 suprida com Si, aumentou até os 20 dai, e decresceu aos 30 dai (Fig. 7B); observou-se aumento significativo na atividade da LOX aos 20 dai nas plantas supridas com Si em comparação com as não supridas (Fig. 7B).

4. Discussão

O suprimento de Si contribuiu para aumentar a atividade das enzimas do metabolismo antioxidante em folhas das plantas de algodoeiro infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Nas plantas da BRS Araçá suprida com Si, houve incremento na atividade da SOD, CAT, e GR até os 20 dai e ao mesmo tempo redução na concentração de H₂O₂. O incremento na atividade da SOD, CAT e APX nas plantas da FM 993 supridas com Si a partir dos 20 dai levou a decréscimos na concentração de H₂O₂.

Estresses bióticos e abióticos podem resultar em aumento na energia de excitação, excedendo a quantidade requerida no metabolismo das plantas (Asada, 1999). Dessa forma ocorre a formação excessiva de EROs que levam ao estresse oxidativo, portanto estas devem ser eliminadas através de enzimas detoxificantes (Asada, 1999). A

enzima superóxido dismutase (SOD) inicia a desintoxicação de O_2^- através da formação de H_2O_2 , que também está sendo tóxico e deve ser eliminado pela conversão para H_2O em reações subseqüentes (Mittler, 2002). Nas plantas, um número de enzimas regulam os níveis intracelulares de H_2O_2 , mas CAT e APX são consideradas as mais importantes (Mittler, 2002; Noctor e Foyer, 1998). Radicais superóxido (O_2^-) são subprodutos tóxicos do metabolismo oxidativo e pode interagir com H_2O_2 para formar radicais altamente reativos, como por exemplo, o radical hidroxila (OH^\cdot), que é tido como o principal responsável pela toxicidade de oxigênio na célula (Azevedo Neto et al., 2005). A dismutação do O_2^- em H_2O_2 e oxigênio é um passo importante na proteção celular, e é catalisada pela SOD (Mittler, 2002).

Na cultivar FM 993 o Si potencializou a atividade das enzimas SOD, CAT e APX, enquanto que na cultivar BRS Araçá foi a atividade das enzimas SOD, CAT e GR. A magnitude do aumento na atividade SOD ocasionou aumento na atividade das enzimas CAT, APX e GR, resultando em redução nas quantidades de H_2O_2 nas plantas de algodão infectadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O aumento na atividade da SOD nas folhas das plantas supridas com Si pode ter contribuído para redução nos níveis de O_2^- e, por consequência, na redução da peroxidação de lipídios. Scandalios (1993) afirma que o O_2^- e seus derivados são altamente tóxicos ao metabolismo das plantas e podem reagir com os ácidos graxos insaturados na membrana plasmática causando a peroxidação desses.

Zhu et al. (2004) mostraram que os efeitos do estresse salino sobre enzimas antioxidantes variou entre espécies de plantas e tipo de estresse. Diferentes efeitos sobre a atividade da CAT e APX foram constatados em diferentes cultivares de pepino infectadas por *P. melonis* (Mohaghegh et al., 2011), a doença conhecida por morte verde afetou de maneira diferente as enzimas antioxidantes estudadas, e as plantas doentes apresentaram maior atividade da APX, e esta foi maior do que a da CAT. Zhu et al. (2004) relataram que o fornecimento de Si as plantas aumentou as atividades da SOD e CAT, mas houve decréscimo na atividade da APX em mudas de tomate expostas ao estresse salino.

A redução nas concentrações de H_2O_2 nas folhas das plantas da BRS Araçá supridas com Si, possivelmente foi devido a maior atividade da CAT; enquanto nas folhas das plantas da FM 993, deve-se a atividade da CAT e APX, fortacendo a hipótese de que essas enzimas foram importantes para diminuir a concentração de H_2O_2 produzido nos tecidos infectados pelo patógeno. Al-Aghabary et al. (2004) mostraram

que em plantas que receberam Si houve uma diminuição na produção de H_2O_2 induzida pela salinidade. Assim, a maior atividade da CAT nas plantas da BRS Araçá e da CAT e APX nas plantas da FM 993 fortalecem a hipótese de que essas enzimas foram importantes para diminuir a concentração de H_2O_2 produzido nos tecidos infectados pelo patógeno.

As concentrações de MDA podem ser um indicador de danos celulares induzidos pela infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, pois as maiores concentrações de MDA encontradas nas plantas da BRS Araçá supridas com Si a partir dos 10 dai, possivelmente, estão associados com a maior atividade da LOX, constatadas nesse mesmo período. Nas plantas da FM 993 suprida com Si, as concentrações de MDA decresceram até os 20 dai, enquanto que a atividade da LOX aumento até os 20 dai. Uma das explicações sobre o efeito do Si na proteção de plantas contra estresses bióticos se dá através de uma melhor proteção das membranas por sistemas antioxidantes, embora o aumento na atividade da LOX sejam evidentes, o que possivelmente resulta em desestruturação de membranas. Rance et al. (1998) sugerem que em plantas que receberam Si, a maior atividade da LOX seja devido a sua atuação na quebra de ácidos graxos poli-insaturados que são lançados devido aos danos a membrana causadas pelas EROs e, assim, poderiam ser úteis para minimizar os efeitos deste dano ao invés de causar uma destruição das membranas. Possivelmente, nas plantas da FM 993 supridas com Si, a menor concentração de MDA, mesmo sob maior atividade da LOX, pode ser atribuída à quebra de ácidos graxos poli-insaturados pela LOX, e pela redução das EROs pela SOD, CAT e APX.

Liang et al. (2003) demonstraram que a concentração de MDA e o extravasamento de eletrólitos foram menores nas plantas supridas com Si na presença de altos níveis de sódio. Além disso, Liang et al. (2006) mostraram que na presença do Si, houve aumento na atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática e uma maior estabilidade dos lipídios nelas contidos. No tocante a estresse de ordem biótica, Mohaghegh et al. (2011) observaram que nas raízes de pepino supridas com Si e infectadas por *P. melonis* ocorreu diminuição na permeabilidade da membrana plasmática das células das raízes, além de redução na peroxidação lipídica. Também é possível que a redução de danos às membranas estejam associados ao papel que a LOX tem na prevenção da infecção fúngica atuando em rotas de sinalização de defesa (Montillet et al., 2002) e o Si esteja protegendo as plantas contra estresses bióticos (Ma, 2004).

Os resultados do presente estudo permitem concluir que em plantas supridas com Si e infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, o metabolismo antioxidativo esteja atuando na eliminação das EROs. O Si nas plantas de algodoeiro aumentou a atividade da SOD, CAT e APX, que reduziram as quantidades de H₂O₂. Desse modo, o Si afetou o metabolismo antioxidante das plantas de algodoeiro aumentando, assim, a resistência ao estresse oxidativo decorrente do processo infeccioso de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* através da eliminação das EROs.

5. Referências

- Adatia, M. H., Besford, R. T. (1986). The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany*, 58, 343-351.
- Al-Aghabary, K., Zhu, Z., Shi, Q. (2004). Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal Plant Nutrition*, 12, 2101-2115.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Revision Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50, 601.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., Laakso, S. (1981). Lipoxygenases from soybeans. In: Lowenstein, J. M. (Ed), *Methods in Enzymology* (pp 441-451). New York: Academic Press.
- Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., Medeiros, J. V. R., Gomes-Filho, E., (2005). Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. *Journal Plant Physiology*, 162, 1114-1122.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 487-97.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cakmak, I., Horst, W. J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities on root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83, 463-468.

- Campos-Vargas ,R., Saltveit, M. E. (2002). Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiologia Plantarum*, 114, 73-84.
- Costa, A. S., Fraga Júnior, C. G. (1937). *Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro*. Campinas: Instituto Agrônômico, 23p. (Boletim Técnico, 19).
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, 13454-13459.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.
- Gay, C., Gebicki, J. M. (2000). A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 284, 217-220.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
- Gong, H., Chen, K., Chen, G., Wang, S., Zhang, C. (2003). Effects of silicon on the growth of wheat and its antioxidative enzymatic system. *Chinese Journal of Soil Science*, 34, 55-57.
- Havir, E. A., McHale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84, 450-455.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Cal agric. Exp. Sta. Cir.* 32.
- Korndörfer, G. H., Pereira, H. S., Nolla, O. A. (2004). *Análise de silício: solo, planta e fertilizante*. Uberlândia, MG, Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia, 34p.
- Kuo, M. C., Kao, C. H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 149-152.
- Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H., Ding, R. X. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 160, 1157-1164.
- Liang, Y. C., Zhang, W. H., Chen, Q., Liu, Y. L., Ding, R. X. (2006). Effect of exogenous silicon (Si) on H⁺-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma

membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 57, 212-219.

Ma, J. F. (2004). Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50, 11-18.

Ma, J. F., Takahashi, E. (2002). Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. *Elsevier Science*.

Marrur, C. J., Ruano, O. (2001). A reference system of determination of cotton plant development. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, 5, 313-317.

McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195-218.

Mehta, Y. R., Zandoná, C., Bibanco, K., Almeida, W. P., Teixeira, E. A., Cunha, H. C., Erivaldo, J. (2005). Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica*, 31, 142-145.

Mohaghegh, P., Khoshgoftarmansh, A. H., Shirvani, M. (2011). Effect of silicon on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Disease*, 95, 455-460.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7, 405-410.

Moller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561-91.

Montillet, J. L., Agnel, J. P., Ponchet, M., Vaillau, F., Roby, D., Triantaphylides, C. (2002). Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 40, 633-639.

Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.

Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Revision Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.

Paranidharan, V., Palaniswami, A., Vidhyasekaran, P., Velazhahan, R. (2003). Induction of enzymatic scavengers of active oxygen species in rice in response to infection by *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25, 91-96.

- Pinheiro, H. A., DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B., Loureiro, M. E. (2004). Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, *167*, 1307–1314.
- Rance, I., Fournier, J., Esquerre-Tugaye, M. T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, *95*, 6554-6559.
- Ranganathan, S., Chandrasekhara Rao, C., Suvarchala, V., Rajesh, Y. B. R. D., Jagdesh, B. (2006). Solubilization of silica: synthesis, characterization and study of penta-coordinated pyridine N-oxide silicon complexes. *Journal Chemistry Science*, *116*, 169-174.
- Samuels, A. L., Glass, A. D. M., Ehret, D. L., Menzies, J. G. (1993). The effects of silicon supplementation on cucumber fruit: Changes in surface characteristics. *Annual Botanic*, *72*, 433-440.
- Shaner, G., Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, *67*, 1051-1056.
- Suassuna, N. D., Coutinho, W. M. (2011). Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil* (pp 567-612). Brasília: Abrapa. 2011.
- Svalheim Ø, Robertsen B. (1993). Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyls segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell wall of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiologia Plantarum*, *88*, 675-681.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S., Wang, Z. (1996). Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant Soil*, *179*, 261-268.
- Zhang, G. L., Dai, Q. G., Zhang, H. C. (2006). Silicon application enhances resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*) in rice. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, *32*, 600-606. (in Chinese).
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, *167*, 527-533.

Tabela 1. Área abaixo da curva do índice da ramulose (AACIR) e concentração foliar de silício (Si) (g/kg) em plantas de algodão das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

		AACIR		Si (g/kg)	
Cultivares		BRS Araçá	FM 993	BRS Araçá	FM 993
Silício	-Si	1325 Ab	1900 Aa	0,70 Ba	0,90 Ba
	+Si	1050 Bb	1287 Ba	12,20 Aa	8,10 Ab
Valores de <i>F</i>					
		AACIR		Si	
Cultivares (C)		36,38**		3,96 ^{ns}	
Silício (Si)		43,41**		89,76**	
C × Si		6,25*		4,67*	
C.V. (%)		15,31		36,64	

** e * $P \leq 0,01$ e $0,05$: significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste-*F*

^{ns}: não significativo; C.V.: coeficiente de variação

Médias na coluna seguidas de mesmas letras maiúsculas ou médias na linha seguidas de letras minúsculas distintas, são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Análise de variância para as atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade da lipoxigenase (LOX) e concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá e FM 993 crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

	SOD	CAT	APX	GR	H ₂ O ₂	LOX	MDA
Cultivares (C)	8,42*	2,94 ^{ns}	3,67 ^{ns}	8,74**	0,25 ^{ns}	7,51**	0,03 ^{ns}
Silício (Si)	1,07 ^{ns}	0,64 ^{ns}	6,00*	1,40 ^{ns}	0,01 ^{ns}	5,42*	6,24*
C × Si	2,49 ^{ns}	1,52 ^{ns}	2,79 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,21 ^{ns}
C. V. (%)	37,24	35,71	21,03	48,81	41,06	45,44	36,77
Cultivares							
BRS Araçá	0,17	0,10	0,13	0,09	13,97	256,66	54,40
FM 993	0,30	0,14	0,16	0,39	14,98	339,69	55,22
DMS	0,09*	0,04 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,20*	3,93 ^{ns}	60,33*	8,97 ^{ns}
Silício (Si)							
-Si	0,21	0,11	0,13	0,30	14,56	333,47	60,44
+Si	0,26	0,13	0,17	0,18	14,46	262,88	49,18
DMS	0,09 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,03*	0,20 ^{ns}	3,93 ^{ns}	60,33*	8,97*

**,* = significativo a 1 e a 5% de probabilidade pelo teste de *F*, respectivamente.

* = significativo a 5% de probabilidade pelo teste-*t*.

^{ns}= não significativo.

C.V. = coeficiente de variação.

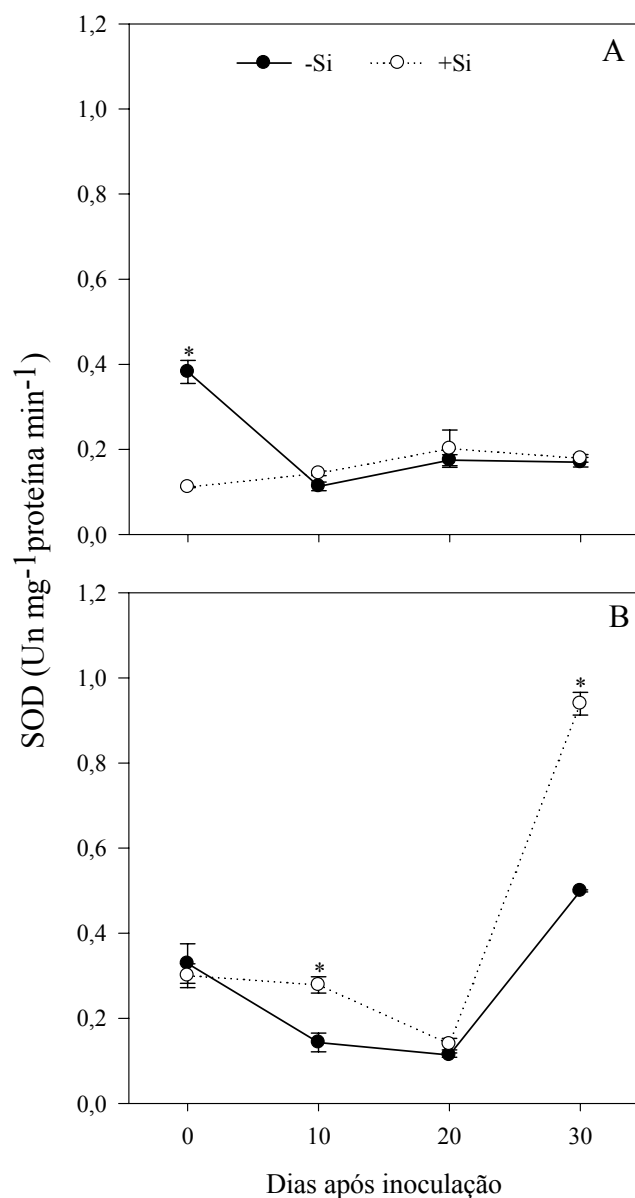


Figura 1. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

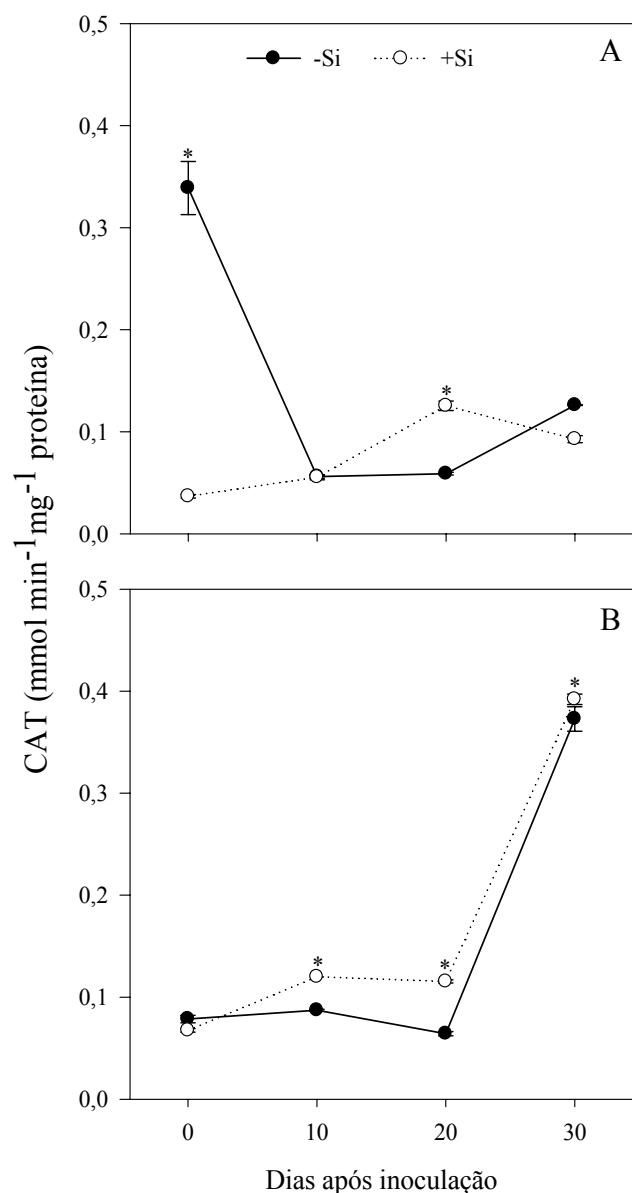


Figura 2. Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

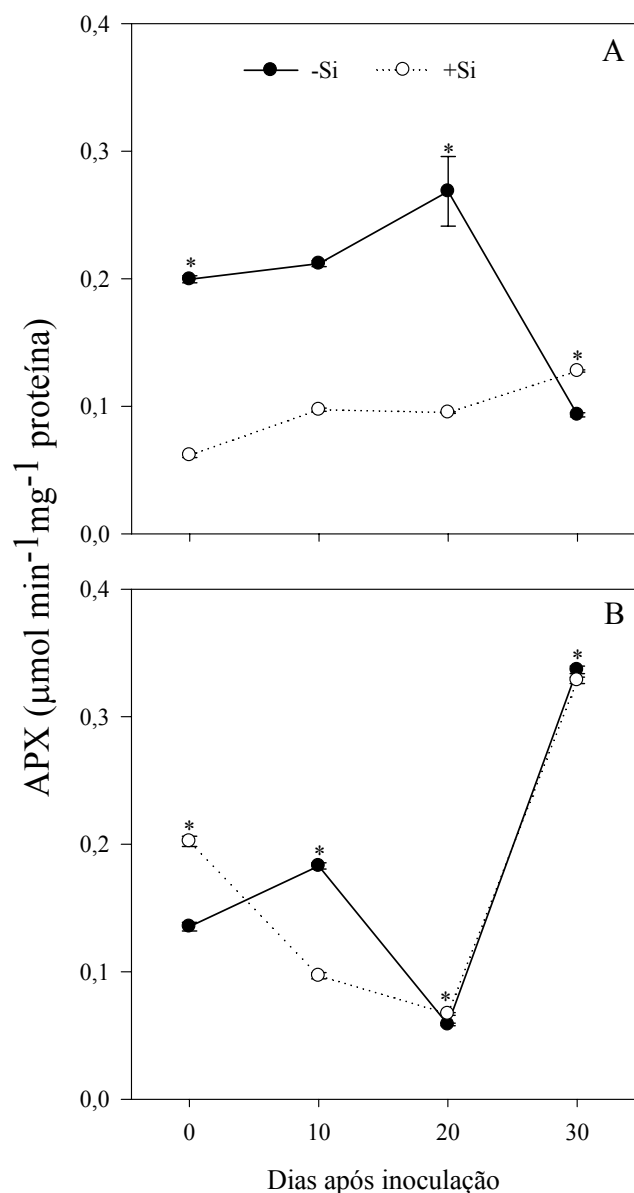


Figura 3. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

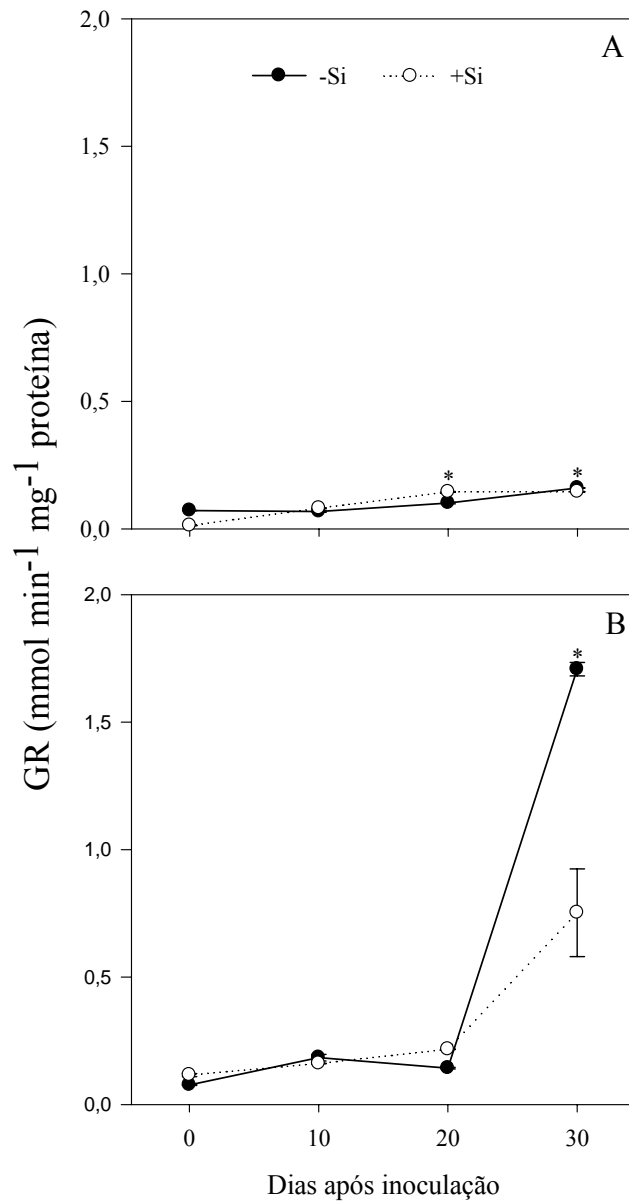


Figura 4. Atividade da glutationa redutase (GR) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

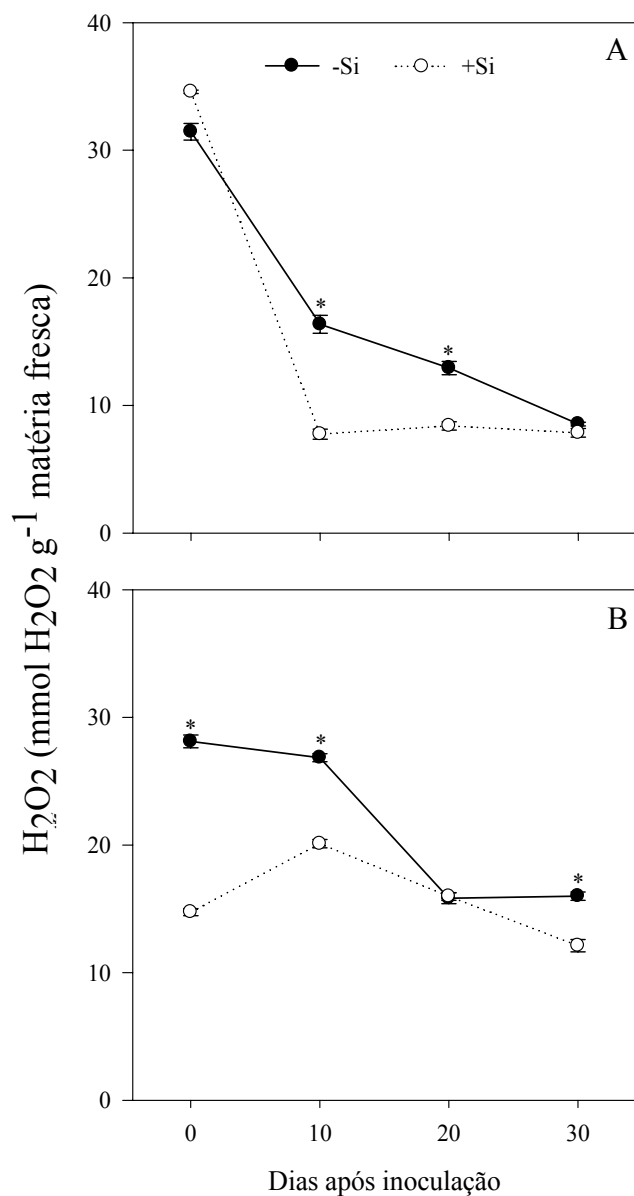


Figura 5. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-t a 5% de probabilidade.

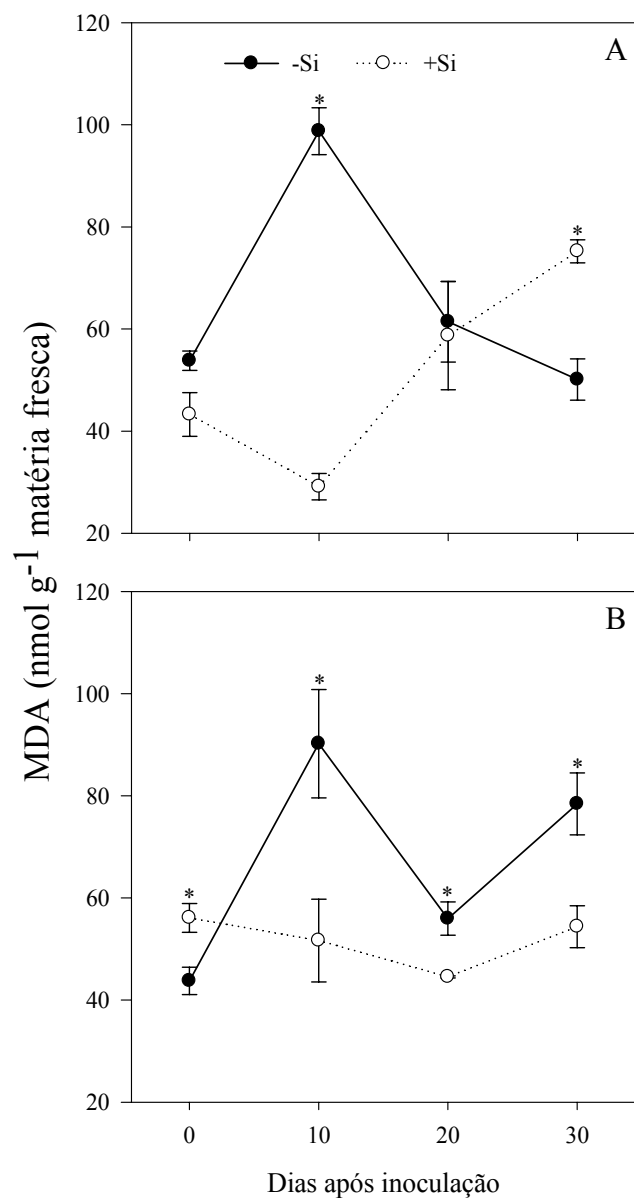


Figura 6. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

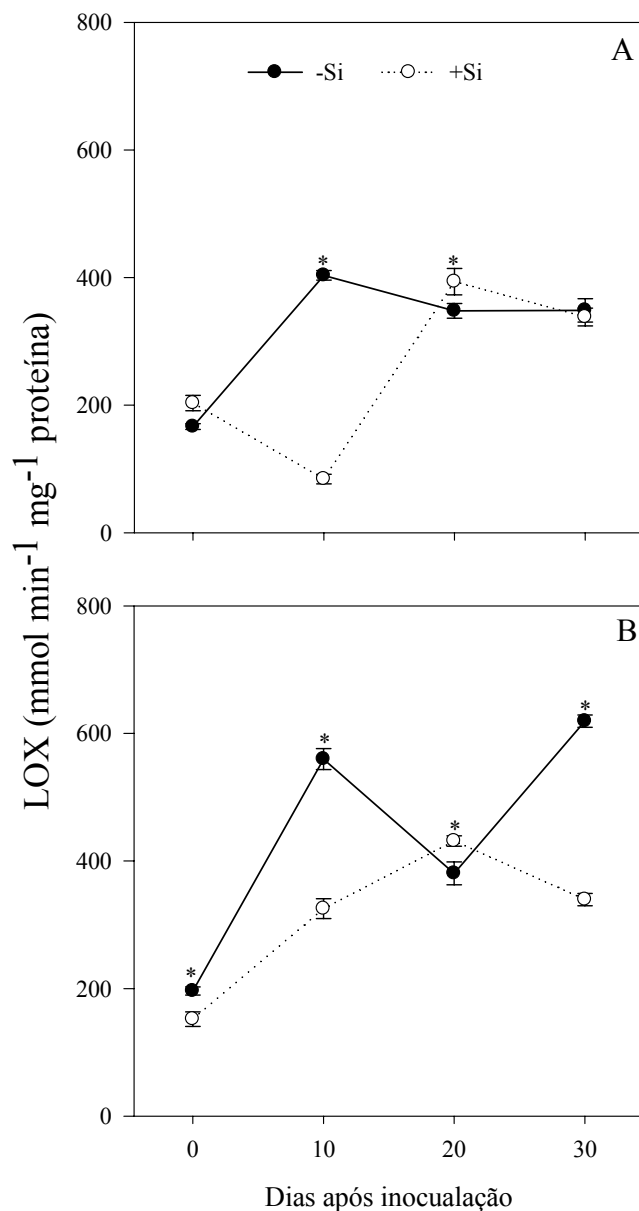


Figura 7. Atividade da lipoxigenase (LOX) em folhas de plantas de algodão das cultivares BRS Araçá (A) e FM 993 (B) crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) para cada época de avaliação são diferentes pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O fornecimento de Si às plantas de algodoeiro pode potencializar a resistência à ramulose, o que pode ser explicado por:

- maior concentração de compostos fenólicos solúveis totais e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico;
- maior atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, quitinase, glicanase e fenilalanina amônia-liase;
- incremento no acúmulo de matéria seca total devido a maior na taxa de assimilação líquida de carbono, condutância estomática e fixação de carbono;
- maior atividade das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e lipoxigenase;
- menor concentração de peróxido de hidrogênio e aldeído malônico;
- eliminação das espécies reativas de oxigênio.