

CARMEN ROSA DA SILVA CURVÊLO

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA RESISTÊNCIA
DO ALGODÃO À MANCHA DE RAMULÁRIA 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
2012

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

T

C981a
2012

Curvêlo, Carmen Rosa da Silva, 1980-
Análises fisiológicas e bioquímicas da resistência do
algodão à mancha de ramulária mediada pelo silício / Carmen
Rosa da Silva Curvêlo. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 113f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo Geraldo Berger.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Algodão - Doenças e pragas. 2. Enzimas. 3. Fertilização
de plantas. 4. Silício. 5. Fotossíntese. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.5194

Aos meus pais, Elinardo Freire Curvêlo e Maria Auxiliadora da Silva Curvêlo, por não terem se enganado em sempre conceder apoio aos meus estudos.

Aos meus irmãos, Edlane, Elaine e Eginardo, pelo carinho.

Aos meus sobrinhos, Letícia e Davi, pela alegria que me proporcionam.

OFEREÇO

À minha filha, Larissa, amor incondicional em minha vida, por me dar a tarefa mais importante do mundo que é a de ser mãe.

Ao meu esposo, companheiro e amigo, Alexandre Igor, por todo o apoio e incentivo, pela paciência transmitida nos momentos de dificuldade, principalmente, pelo amor dedicado sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por está sempre ao meu lado me orientando para sempre seguir o caminho certo e por ter me dado força e sabedoria para transpor as dificuldades encontradas durante esta caminhada e por permitir a concretização deste trabalho.

A minha família pelo constante amor, apoio, incentivo e pela confiança.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

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

Ao Laboratório Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pela utilização dos equipamentos.

Ao Professor Paulo Geraldo Berger, pelo aceite em me orientar durante o curso de Doutorado e pela confiança.

Em especial ao Professor Fabrício Ávila Rodrigues, pelos ensinamentos, paciência, confiança, agradável convivência e pelo apoio constante no planejamento, execução e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Fábio Murilo DaMatta, pela co-orientação e participação na banca examinadora.

Ao Professor Luis Cláudio Vieira da Cunha e ao Pesquisador Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, pela participação na banca examinadora.

Aos demais professores do Departamento de Fitotecnia e de Fitopatologia, pela convivência harmoniosa e pela contribuição para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos colegas do Laboratório Interação Planta-Patógeno pela ajuda na execução das análises em laboratório e pela convivência no decorrer do curso.

A todos que, direta ou indiretamente, acreditaram em mim e me ajudaram a construir e realizar mais esse sonho.

BIOGRAFIA

CARMEN ROSA DA SILVA CURVÊLO, filha de Elinardo Freire Curvêlo e Maria Auxiliadora da Silva Curvêlo, nasceu em 21 de setembro de 1980, em Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Em 1999, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal da Paraíba, onde, em 2004, obteve o título de Engenheira Agrônoma.

Em setembro de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal da Viçosa (UFV), defendendo sua Tese em fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. Introdução geral	10
2. Revisão de Literatura	12
2.1 O Algodão	12
2.2 A mancha de ramulária	14
2.2.1 Etiologia da mancha de ramulária	14
2.2.2 Epidemiologia da mancha de ramulária	15
2.2.3. Sintomas da mancha de ramulária	15
2.2.4 Manejo da mancha de ramulária	17
2.3 Doenças e mecanismos de defesa das plantas	19
2.4 Silício	20
2.4.1 Fontes de Silício	22
2.4.2 Silício nas plantas	22
2.4.3 O silício no controle das doenças	23
3. Referências	25
CAPÍTULO 1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA DO ALGODÃO À MANCHA DE RAMULÁRIA MEDIADA PELO SILÍCIO	31
Resumo	32
1. Introdução	33
2. Material e métodos	34
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão	34
2.2 Obtenção e preparação do inóculo de <i>Ramularia areola</i> e inoculação das plantas de algodão.....	35
2.3 Avaliação de componentes de resistência e da severidade da mancha de ramulária	35
2.4 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG)	37
2.5 Determinação da atividade de enzimas de defesa	38
2.5.1 Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)	38
2.5.2 Atividade de polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1).....	38
2.5.3 Atividade de quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)	39
2.5.4 Atividade de β -1,3-glicanases (GLI, EC 3.2.1.6)	39

2.5.5 Atividade da fenilalanina amônia-liases (FAL, EC 4.3.1.5).....	40
2.6 Determinação da concentração foliar de Si	40
2.7 Delineamento experimental e análise estatística	40
3. Resultados	41
3.1 Componentes de resistência, AACPMR e concentração foliar de Si	41
3.2 Correlação de Pearson	41
3.3 Concentração de CFST e LATG.....	41
3.4 Atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLI e FAL.....	42
4. Discussão	43
5. Referências.....	47
CAPÍTULO 2. METABOLISMO ANTI-OXIDATIVO EM PLANTAS DE ALGODÃO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR <i>RAMULARIA AREOLA</i>	60
Resumo	61
1. Introdução	62
2. Material e métodos	63
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão	63
2.2 Obtenção e preparação do inóculo de <i>R. areola</i> e inoculação das plantas de algodão	64
2.3 Avaliação da severidade da mancha de ramulária	65
2.4 Determinação bioquímicas	65
2.5 Determinação das atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo anti- oxidativo	65
2.5.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	66
2.5.2 Determinação das atividades da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	66
2.5.3 Determinação da atividade da peroxidase ascorbato (APX EC 1.11.1.11)	67
2.5.4 Determinação das atividades redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7).....	67
2.6 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	68
2.7 Determinação do aldeído malônico (MDA)	68
2.8 Determinação do extravasamento de eletrólitos (EE).....	69
2.9 Determinação da atividade de lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12).....	69
2.10 Determinação da concentração foliar de Si	70
2.11 Delineamento experimental e análise estatística	70
3. Resultados.....	70

3.1 Concentração foliar de Si e AACPMR	70
3.2 Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo.....	71
3.3 Concentração de H ₂ O ₂	71
3.4 Concentração de MDA	71
3.5 EE.....	71
3.5 Atividade da LOX.....	72
3.6 Atividade das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo	72
4. Discussão	72
5. Referências.....	74
CAPÍTULO 3. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE PLANTAS DE ALGODÃO SUPRIDAS COM SILÍCIO E INFECTADAS POR RAMULARIA AREOLA	89
Resumo	90
1. Introdução	91
2. Material e métodos	92
2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão	92
2.2 Obtenção e preparação do inóculo de <i>R. areola</i> e inoculação das plantas de algodão	93
2.3 Avaliação da severidade da mancha de ramulária	93
2.4 Determinação das trocas gasosas	93
2.5 Determinação da concentração de pigmentos.....	94
2.6 Determinação da concentração foliar de Si	94
2.7 Delineamento experimental e análise estatística	94
3. Resultados.....	95
3.1 AACPMR e concentração foliar de Si.....	95
3.2 Trocas gasosas	95
3.3 Concentração de pigmentos	96
3.4 Correlação de Pearson	97
4. Discussão	97
5. Referências.....	100
CONCLUSÕES FINAIS	113

RESUMO

CURVÊLO, Carmen Rosa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Análises fisiológicas e bioquímicas da resistência do algodão à mancha de ramulária mediada pelo silício.** Orientador: Paulo Geraldo Berger. Coorientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Fábio Murilo DaMatta.

A ocorrência de doenças é um problema que afeta boa parte das áreas cultivadas no Brasil, sobretudo aquelas situadas na região centro-oeste do país. Apesar do silício (Si) não ser considerado um elemento essencial as plantas, esse nutriente reduz a severidade de inúmeras doenças em diversas espécies vegetais, aumentando a resistência das plantas ao ataque por patógenos. Contudo, apesar deste efeito benéfico ser amplamente relatado na literatura, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos por esse elemento no patossistema algodão-*Ramularia areola*. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do Si em reduzir os sintomas da mancha de ramulária, bem como investigar os aspectos fisiológicos e bioquímicos da resistência mediada por esse elemento. Plantas de algodão das cultivares NuOpal (susceptível) e BRS Buriti (moderadamente resistente) foram cultivadas em vasos com solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) Si. A aplicação de Si reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha de ramulária (AACPMR) e aumentou a concentração de compostos fenólicos e de derivados da lignina-ácido tioglicólico nas plantas de algodão das duas cultivares, e aumentou a atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), quitinase (QUI), β -1,3-glicanases (GLI) e da fenilalanina amônia-liases (FAL) nas plantas da cultivar NuOpal, porém a atividade das enzimas PFO e FAL nas plantas da cultivar BRS Buriti não foram potencializadas pelo Si. O fornecimento de Si às plantas de algodão das duas cultivares ocasionaram em menores concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e redução na atividade da catalase (CAT), enquanto que aumentos na atividade das enzimas APX, SOD e GR podem ter contribuído para reduzir as concentrações de MDA e EE para as duas cultivares. Houve aumentos na atividade da lipoxigenase (LOX) em plantas supridas com Si das duas cultivares e reduções nos parâmetros de trocas gasosas. O fornecimento de Si as plantas de algodão das duas cultivares aumentou a taxa líquida de fixação de CO_2 (A) em paralelo a aumentos em condutância estomática (g_s). As concentrações de clorofila a (cl_a), clorofila b (cl_b) foram maiores nas plantas supridas com Si em estádios mais avançados da infecção para cultivar NuOpal, porém os carotenóides foram os que sofreram menor alteração.

ABSTRACT

CURVÊLO, Carmen Rosa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Physiological and biochemical analysis of the resistance of cotton to Areolate mildew mediated by silicon.** Adviser: Paulo Geraldo Berger. Co-advisers: Fabrício de Avila Rodrigues and Fábio Murilo DaMatta.

The occurrence of diseases is a major problem that affects most of the cropland in Brazil, especially those located in the Midwest of region. Although silicon (Si) is not considered an essential element in plants, this nutrient has been shown to reduce the severity of many diseases in many plant species when accumulated in the shoot there by increasing plant resistance against pathogen attack. Respite this beneficial effect is widely reported in the literature, little is known about the Physiological and Biochemical mechanisms regulates by this element in the cotton-*Ramularia areola* pathosystem. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of Si in reducing Areolate mildew symptoms, as well as investigate the physiological and biochemical aspects of resistance mediated by this element. Cotton plants of the cultivars NuOpal (susceptible) and BRS Buriti (moderately resistant) were grown in pots with nutrient solution containing silicon (+Si) or not (-Si). The Si application reduced the area under the Areolate mildew progress curve (AUPCAM) in cotton plants. The increase in the concentration of phenolic compounds and derivatives of lignin-thioglycolic acid in plants of the two cultivars supplied with Si, and the increased activity of defense enzymes peroxidase (POX), polyphenol-oxidase (PPO), chitinase (CHI), β -1, 3-glicanase (GLI) and phenylalanine ammonia-lyase (FAL) in plants of the cultivar NuOpal, potentiated the chemical defensive mechanisms against pathogen infection, as reported in the literature, but the PPO and FAL enzyme activity in BRS Buriti plants were not enhanced by Si. The provision of Si to the cotton plants of the two cultivars resulted in higher concentrations of H₂O₂ by reducing the activity of CAT, while increases in the activity of the enzymes APX, SOD and GR may have contributed to reduce the concentrations of MDA and EE for both cultivars. There were significant increases in LOX activity in plants supplied with Si of both cultivars. The supply of Si cotton plants of two cultivars increased the net rate of fixation of CO₂ (A) in parallel with increases in stomatal conductance (g_s). The concentrations of chlorophyll a (cl_a), chlorophyll b (cl_b) were higher in plants supplied with Si at later stages of infection to grow NuOpal but carotenoids were those who suffered less alteration.

1. Introdução Geral

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) considerado uma das principais riquezas do setor agrícola do Brasil e do mundo, exercendo grande importância em termos produtivos, econômicos e sociais, expressa na sua pluma ou fibra seu produto principal. Dentre as fibras têxteis, naturais ou artificiais, a pluma é a mais importante pela multiplicidade e qualidade de aplicação (Freire, 2011). A cultura do algodão caracteriza-se por apresentar altos custos de produção, alta dependência de processos mecanizados, baixos índices pluviométricos e rigorosos critérios de avaliação de qualidade (Beltrão, 2008).

A cotonicultura tem grande importância na geração de emprego e renda no Brasil, especialmente nos setores primários e industriais e segundo a Conab (2011), encontra-se presente na maioria de seus estados, com previsão de uma produção de 1,96 milhão de toneladas de fibra e produtividade média de 3700 kg/ha de algodão em caroço na safra 2010/2011 (Conab, 2011).

Desde o final da década de 90, a região Centro-Oeste apresenta as maiores áreas cultivadas com algodão. Estima-se que para safra 2010/2011, essa área chegue a 893,5 mil hectares plantados, assim como a produção estimada em 1,2 milhão de toneladas em pluma e produtividade de 3600 kg/ha de algodão em caroço (Agrianual, 2011; Conab, 2011).

As condições edafoclimáticas dos cerrados brasileiros são peculiares, devido à topografia plana, com baixos teores de macro e micronutrientes. O clima, porém é marginal a cultura do algodão, em função da precipitação excessiva (acima de 1500 mm anuais), altitude e umidade elevada e temperaturas noturnas amenas favorecem a incidência de doenças fúngicas. Nestas condições, as cultivares nacionais apresentam ciclo mais prolongado, fibras de boa qualidade tecnológica, alta suscetibilidade às epidemias de etiologias variadas (Freire, 2011).

A exploração da cultura do algodão e seu intenso crescimento no país estão fundamentados em sistema de produção atualmente baseado no cultivo de extensas áreas e adoção de novas tecnologias, como a mecanização tecnificada em toda a lavoura e uso intensivo de insumos agrícolas, porém com poucas cultivares, muitas suscetíveis a pelo menos uma doença importante. Tudo isso leva ao agravamento de doenças antes

consideradas pouco significativas, como por exemplo, a mancha de ramulária (Maranha et al., 2002; Suassuna & Coutinho, 2011).

Nas principais áreas produtoras de algodão a mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* é uma doença de grande importância em virtude das condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do patógeno aliadas ao uso de cultivares suscetíveis e também pelos elevados custos com o seu controle (Iamamoto, 2003). Hoje, a mancha de ramulária é sem dúvida, a principal doença foliar da cultura do algodão na região do centro-oeste brasileiro, por ocorrer com maior frequência e severidade, causando os maiores danos e perdas, exigindo assim esforços e gastos no seu controle (Suassuna & Coutinho, 2011). A doença encontra-se disseminada em praticamente todas as áreas de cultivo do algodão do país, apresentando manchas de coloração branca ou amarelada e aspecto farináceo (pulverulento) delimitadas pelas nervuras. Essas manchas podem ocorrer em todo o limbo foliar, no caso de alta incidência e provocar queda das folhas (Suassuna & Coutinho, 2011).

Na maioria das regiões produtoras de algodão, a principal e a mais eficiente estratégia de manejo adotada atualmente para o controle da doença tem sido feita por meio de aplicação de fungicidas, sendo necessário de três a quatro aplicações durante o ciclo da cultura (Andrade et al., 1999). Todavia, já existem relatos que as aplicações com fungicidas para o controle da mancha de ramulária na região centro-oeste do país, em particular no estado do Mato Grosso já chegam a oito por ciclo da cultura. Portanto, estudar e propor estratégias de manejo que integrem medidas sustentáveis como uso de cultivares resistentes, uso de fungicidas (menos impactantes ao meio ambiente), manejo cultural (possibilitando a planta usar melhor os recursos do meio, suplantando em parte os danos causados pela doença) permite desenvolver um programa de manejo integrado da mancha de ramulária.

A utilização de métodos biológicos ou outros métodos profiláticos como o uso de silício desponta como uma alternativa de manejo integrado de doenças e vem despertando bastante interesse, principalmente pelo potencial de uso comercial e baixo impacto ambiental dos fertilizantes silicatados (Ferreira, 2008). Desta forma, o interesse pela adubação silicatada está crescendo bastante no Brasil, principalmente pela disponibilidade de fontes comerciais (Boylton et. al., 1990; Shia & Wang, 1998).

Características morfológicas e fisiológicas dos órgãos fotossintetizantes, basicamente as folhas e os órgãos consumidores dos metabólitos fotossintetizados influenciam diretamente a produtividade do algodão. A

produção de fitomassa é dependente da atividade fotossintética do aparelho fotoassimilador (Taiz & Zeiger, 2009). Desta forma, buscar mais informações sobre a fisiologia da fonte torna-se de extrema importância, e uma forma muito utilizada para estudá-la é por meio de medidas de trocas gasosas. Apesar das afirmações sobre os efeitos positivos do silício sobre a fotossíntese, não há estudos diretos que meçam a fotossíntese em função da nutrição silicatada para a cultura do algodão.

Inúmeros estudos têm demonstrado o envolvimento do silício em vários aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos nas plantas, com papéis bastante variados. Entretanto, não existe nenhum relato na literatura abordando o efeito de Si sobre o controle da mancha de ramulária em algodão, nem sobre os possíveis mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com o aumento da resistência das plantas a essa doença. Desta forma, o conhecimento dos efeitos do Si sobre a suscetibilidade do algodão à ramulária pode auxiliar no manejo dessa doença.

Diante do exposto acima, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do Si sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com o aumento da resistência em plantas de algodão à mancha de ramulária.

2. Revisão de Literatura

2.1 O algodão

O algodão é uma planta oleaginosa da família Malvaceae pertencente ao gênero *Gossypium* que abrange 52 espécies, sendo que das espécies cultivadas apenas quatro tem importância econômica, como *G. barbadense* L., segunda espécie mais cultivada respondendo a 5% da produção mundial e as espécies *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. que, em conjunto, respondem pelos restantes 5% da produção. O *G. hirsutum* L., é a espécie mais importante do gênero, contribui para a quase totalidade da fibra, sendo responsável por 90% da produção mundial em fibras (Bolek, 2005).

O algodão herbáceo (*G. hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) é uma planta que apresenta uma grande complexidade morfológica, de clima quente, possuindo hábito de crescimento indeterminado (Fuzatto et al., 2005). O período vegetativo é longo, variando entre 5 e 7 meses, conforme a quantidade de calor recebida. Por isso, necessita de verões longos, quentes e bastante úmidos. No entanto, na maturação, quando se

abrem as cápsulas, a chuva é prejudicial. Sob condições de clima quente, com duas estações, chuvosa e seca, o algodão encontra condições propícias ao seu desenvolvimento (Carvalho, 2007).

A produção do algodão ocorre em diversos países do mundo, chegando a 25 milhões de toneladas de fibra em que são plantados mais de 33 milhões de hectares. Estima-se que nos próximos 20 anos a humanidade esteja consumindo cerca de 35 milhões de toneladas de fibra por ano e que, num futuro próximo, o Brasil seja o maior produtor dessa malvacea (Beltrão, 2008). A produção nacional esperada para o algodão na safra de 2010/2011 é de 5,1 milhões de toneladas de algodão em caroço, em uma área de 1,4 milhões de hectares plantados, representando um acréscimo de 59,69%, quando comparada à safra 2009/10 que foi de 835,7 mil hectares. Todos os estados produtores apresentaram um significativo aumento da área plantada. (Conab, 2011).

A cotonicultura passou por um período de transição no final da década de 90, levando a um decréscimo considerável na área plantada em lugares onde seu plantio era tradicional, devido a problemas relativos à comercialização da matéria prima e ao surgimento do bicudo em suas plantações e a problemas fitossanitários (Degrande, 1998; Suassuna & Coutinho, 2011). Entretanto, nesse mesmo período 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). Então esse processo de retomada da cultura ao cenário nacional trouxe consigo alguns problemas, dentre os quais sobressai a ocorrência de doenças, que encontraram ambientes amplamente favoráveis para seu desenvolvimento (Paiva, 2001). Por conseguinte, justifica-se a enorme preocupação dos cotonicultores com relação às doenças, uma vez que essas constituem um dos principais problemas fitossanitários da cultura nas principais regiões produtoras do país, chegando a provocar perdas vultosas em cultivares suscetíveis (Freire, 2011).

Portanto, o Cerrado brasileiro apresenta condições favoráveis para o cultivo do algodão, tais como temperatura amena e precipitações adequadas, favorecendo assim o surgimento e desenvolvimento de doenças fúngicas antes consideradas de importância secundária. Dentre elas destaca-se a mancha de ramulária (Maranha et al., 2002).

2.2 A mancha de ramulária

A mancha de ramulária é uma das principais doenças da cultura do algodão em países como Madagascar e Índia sendo, neste último, em algumas safras responsáveis por perdas acima de 60% da produção (Cauquil & Sément, 1973; Shivankar & Wangikar, 1992).

No Brasil, essa doença começou a ter destaque no final da década de 90, pois antes era considerada uma doença secundária, por não causar prejuízos econômicos. Entretanto, com o aumento da área cultivada de algodão na região do cerrado e o uso de cultivares suscetíveis, a doença passou a surgir mais cedo, sendo considerada, hoje, a principal doença da cultura nesta região, com perdas que podem chegar até 50% da produção (Aquino et al, 2008).

Silva et al. (2010) fizeram um levantamento com cerca de 8 mil plantas numa área de 24 mil hectares para avaliar a incidência de diversas doenças em lavouras comerciais de algodão na região do cerrado brasileiro e observaram que a mancha de ramulária se destaca dentre outras doenças que surgem de forma natural, apresentando os maiores índices de incidência em comparação as demais doenças avaliadas independente do estágio fenológico da cultura do algodão.

2.2.1 Etiologia da mancha de ramulária

A mancha de ramulária é causada pelo fungo *Ramularia areola* (Atk.), também conhecido por *Ramularia gossypii* Speg. Ciferi, *Cercospora gossypii* Speg forma assexual ou anamórfica e *Mycosphaerella areola* (Ehrlich & Wolf, 1932) forma sexual ou teleomórfica (Suassuna & Coutinho, 2011). Além de mancha de ramulária, a doença é também conhecida em vários países por míldio, oídio, míldio areolado, falso-míldio ou mancha branca (Maranha et al., 2002; Yamamoto, 2007).

O fungo pode ser propagado em cultivos de plantas de algodão oriundas da destruição inadequada da soqueira ou algodão perene. Assim, repetidos cultivos de algodão na mesma área e a proximidade de plantas cultivadas em anos anteriores (soqueira ou tiguera) podem contribuir como inóculo primário. A fase assexuada ou conidial (ramulária) desenvolve-se sobre o tecido vivo, sobretudo na face inferior das folhas, quando essas ainda estão presas à planta e por um curto período após a sua queda. A fase seguinte, espermogonial, ocorre nas

folhas caídas no solo. Na próxima fase, os ascósporos desenvolvem sobre os restos culturais como folhas e soqueiras, constituindo o inóculo primário (Iamamoto, 2007). Vento, água da chuva ou de irrigação, pessoas e máquinas disseminam o patógeno da mancha de ramulária.

2.2.2 Epidemiologia da mancha de ramulária

Condições climáticas como temperatura em torno de 12 a 32 °C, sendo mais adequada, a faixa de 25 a 30 °C e umidade relativa acima de 80% favorecem o surgimento da mancha de ramulária (Rathaiah, 1977). A doença também é favorecida por noites úmidas seguidas de dias secos, sem períodos prolongados de molhamento foliar (Paiva, 2001). O fungo apresenta conidióforos fasciculados que saem pelos estômatos. Os conidióforos são cilíndricos, hialinos e com um a três septos (Iamamoto, 2007).

Para Rathaiah (1977), a penetração de *R. areola* pelo estômato é maior sob o ciclo de molhamento noturno e secamento diurno do que em molhamento contínuo. Algumas infecções ocorrem depois de dois ciclos de molhamento noturno de 12 horas e o máximo ocorre depois de cada quatro ciclos. O tubo germinativo pode sobreviver por vários ciclos de secamento de até 16 horas com umidade relativa de 20 a 60% e subsequentemente retomar seu crescimento.

Curvelo et al. (2010) relatam que o processo de penetração no hospedeiro ocorre pelos estômatos, em ambas as faces da folha surgem os sinais do patógeno, sendo o tempo necessário para o início da germinação dos conídios em torno de 12 hai (horas após inoculação). Esses produzem, em sua maioria, dois tubos germinativos em suas extremidades.

2.2.3 Sintomas da mancha de ramulária

De acordo com Curvelo et al. (2010) os sintomas iniciais aparecem em ambas as faces da folha do algodão independente do estágio fenológico.

Os sintomas consistem de lesões angulosas com coloração branco-azulada entre as nervuras da folha (Figura 1), medindo de 1 a 3 mm inicialmente e posteriormente, amarelada de aspecto pulverulento, caracterizado pela esporulação do patógeno (Shivankar & Wangikar, 1992; Cassetari Neto et al., 2000; Suassuna & Coutinho, 2011). Após a esporulação ocorre a destruição das células invadidas levando a uma

abscisão da folha (Ehrlich & Wolf, 1932). Uma vez cessada a esporulação ativa, as lesões tornam-se necróticas, de coloração marrom-escuro, acarretando perda da área foliar fotossintetizante e conseqüentemente queda na produção (Holey et al., 1992). Sob condições favoráveis, as lesões agregam-se e provocam desfolha. Em períodos chuvosos podem ocorrer sintomas precoces, chegando a provocar queda de folhas e apodrecimento de maçãs dos ramos mais próximos ao solo (Iamamoto, 2007; Suassuna & Coutinho, 2011).



Figura 1. Sintomas da mancha de ramulária na face adaxial de folhas de algodão.

Entretanto, na literatura existem alguns relatos conflitantes para os sintomas iniciais da doença. Para Suassuna & Coutinho (2011) esses sintomas geralmente coincidem com início da fase reprodutiva da planta, entre o aparecimento do primeiro botão floral até a abertura da primeira flor. Os danos causados pela doença prologam-se até o final do ciclo da cultura, sendo mais expressivos entre o início do florescimento e a abertura dos primeiros capulhos. Mas de acordo com Utimada et al. (2003), os sintomas iniciais surgem na face superior das folhas, contrariando o que dizem Suassuna e Iamamoto (2005) que relataram o surgimento dos sintomas iniciais na face inferior das folhas mais velhas.

2.2.4 Manejo da mancha de ramulária

Atualmente para o patossistema algodão – mancha de ramulária as cultivares em uso no Brasil não possuem resistência vertical a esta doença, sendo o controle químico a medida mais eficaz comumente utilizada para o seu controle. Assim, torna-se necessário o monitoramento diário da lavoura para verificar o aparecimento das primeiras lesões, o que indica a necessidade de aplicação de fungicidas para retardar o início da epidemia e impedir o aumento de inóculo no campo e a multiplicação de ciclos secundários (Iamamoto, 2007; Aquino et al., 2008; Suassuna & Coutinho, 2011). O custo com defensivos químicos é muito alto. Considerando-se serem necessárias de três a quatro aplicações durante o ciclo da cultura (Mehta & Menten, 2006). Todavia, na última safra 2010/2011 foi relatado o uso de oito aplicações por ciclo da cultura na região do cerrado brasileiro (Agriannual, 2011). Outra opção seria a utilização de cultivares geneticamente modificadas (Maranha et al., 2002), que ainda são incipientes no mercado para fins comerciais.

O manejo sustentável parte do princípio de que a doença constitui parte do sistema produtivo e que essa não precisa ser eliminada do sistema e sim mantida em níveis que não causem danos e ocasionem perdas. Dentro dessa visão ampla de manejo sustentável, as medidas devem ser integradas visando redução dos custos de manejo e diminuição do impacto ambiental devido ao uso intensivo de defensivos agrícolas, melhorando a qualidade da produção. Então, o manejo ideal para controle dessa doença seria por meio da integração de técnicas, como uso de cultivares menos suscetíveis ou com algum nível de resistência, época de plantio e aplicação de fungicidas (Andrade et al., 1999).

No manejo das doenças, o uso de cultivares geneticamente modificadas é a tática de controle mais desejável e eficaz por ser de baixo custo, fácil implementação, alta eficácia e não causar danos ao meio ambiente (Maranha et al., 2002; Cia & Salgado, 2005). A resistência genética pode ser implementada em associação com outras medidas de controle como manejo cultural e controle químico. Apesar de cultivares resistentes não estarem disponíveis no mercado existe diferença entre elas com relação à suscetibilidade à mancha de ramulária (Cassetari Neto et al., 2000). Mukewar et al. (1995) analisando a resposta de 489 genótipos de *Gossypium arboreum* à mancha de ramulária observou que 24 deles eram resistentes, sendo que 7 apresentaram resistência

vertical e 17 resistência horizontal. Isso indica que há fonte de resistência à *R. areola* e que é possível a obtenção de cultivares resistentes.

Embora a maioria das cultivares de algodão sejam altamente suscetíveis a mancha de ramulária, existem relatos na literatura de cultivares da espécie *Gossypium hirsutum* com diferentes níveis de resistência, dentre as quais BJA 592 e Reba BTK 12, que podem ser usadas como fonte de resistência. Algumas cultivares de *Gossypium barbadense*, como Pima S7 e Tadla 16, também possuem resistência (Rathaiah, 1976). A cultivar BRS Buriti possui nível intermediário de resistência à mancha de ramulária o que, na prática, significa uma redução no uso de fungicidas quando comparada com uma cultivar altamente suscetível (Suassuna & Yamamoto, 2005). Das cultivares em uso no Brasil, Stoneville 474, Fiber Max 966, IAC 24, Coodetec 407, BRS 269, BRS Camaçari e BRS Araçá são as que possuem maior nível de resistência à *R. areola* (Suassuna & Coutinho, 2011).

A resistência de *Gossypium arboreum* à *R. areola* é dependente dos mecanismos de resistência pré-formados como camada de cutícula mais espessa, células da epiderme mais entrelaçadas, limbo foliar mais espesso e menor número de estômatos, associados com fatores bioquímicos, como níveis constitutivos da enzima fenilalanina amônia liase, compostos fenólicos, flavonóides, gossipol, taninos, prolinas e também a capacidade de induzir taninos (Mukewar & Mayee, 2001; Suassuna & Coutinho, 2011).

Segundo Lucena (2007), a presença de uma variação contínua de graus de resistência à mancha de ramulária para algumas características como pontos necróticos e esporulação, caracteriza herança poligênica. O mecanismo de resistência identificado pelo autor representa uma variação fenotípica contínua para essas características indicando que se trata de uma herança poligênica e a resistência é do tipo horizontal. Esse tipo de resistência é considerado melhor por sua durabilidade, porém a identificação dos locos envolvidos pode ser difícil, em razão da baixa expressão fenotípica dos genes envolvidos.

O programa de melhoramento da Embrapa Algodão tem selecionado genótipos com alta resistência, como as linhagens CNPA CO 11612 e CNPA GO 2984, e com resistência moderada, como a cultivar BRS Buriti. Cultivares com resistência parcial à mancha de ramulária podem ser incorporadas no manejo da doença, visando à redução no número de aplicações de fungicidas (Yamamoto, 2007; Suassuna & Coutinho, 2011).

Embora as cultivares tenham diferido quanto ao grau de suscetibilidade ao patógeno há ainda influência da época de semeadura e de práticas culturais na

severidade da doença (Andrade et al., 1999). O uso de cultivares com algum nível de resistência, principalmente aquelas com arquitetura de copa, que permita ou facilite aeração, aliado a um espaçamento maior e a menor densidade de plantas, pode reduzir a severidade da doença (Hillocks, 1992). Plantio em locais com temperatura elevada durante o dia e amenas durante a noite tende a favorecer o progresso da doença por aumentar o período de molhamento foliar noturno e por ter um período diurno com a folha seca, proporcionando condições ambientais favoráveis à multiplicação do patógeno (Suassuna & Coutinho, 2011). Plantios adensados favorecem a doença devido ao sombreamento que se inicia mais cedo na cultura e ao maior acúmulo de umidade na parte inferior do dossel das plantas (Paiva, 2001). As medidas para se manejar a doença seriam um bom preparo de solo e nutrição adequada já que uma planta bem nutrida e com bom vigor vegetativo apresenta maior capacidade em se defender contra o ataque de um determinado patógeno (Marschner, 1995; Harris, 2001).

Muitos pesquisadores recomendam o uso de cultivares resistentes mesmo que haja redução na produtividade, pois são compensadas pela redução nos custos de produção e redução da preocupação do produtor quanto à perda na produtividade pelo plantio de cultivares mais suscetíveis. Diversos estudos têm caminhado neste sentido, avaliando diversas cultivares e linhagens quanto a sua resistência múltipla às doenças, seu potencial produtivo e adaptabilidade às principais regiões produtoras desta fibra (Lanza et al., 1999; Cassetari-Neto et al., 2001).

2.3 Doenças e mecanismos de defesa das plantas

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 nas plantas (Wróbel-Kwiatkowska et al., 2004).

Plantas expostas a estresses bióticos e/ou abióticos normalmente produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) incluindo o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio singlete (1O_2) (Apel & Hirt, 2004). Caso não ocorra uma rápida remoção das ERO do metabolismo, esses 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 (Scandalios, 1993; Moller, 2001).

Diversos trabalhos têm comprovado que as principais enzimas relacionadas com a defesa, como as peroxidases (POD) (Campos-Vargas & Saltveit, 2002), responsáveis pelo reforço da parede celular através da deposição de lignina; polifenoloxidasas (PFO), que oxidam compostos fenólicos a moléculas mais reativas; quitinases (QUI) e β -1,3-glicanases (GLI) que degradam a parede celular de espécies fúngicas; fenilalanina-amônia liase (FAL) envolvida na rota dos fenilpropanóides (Xu et al., 1998), as enzimas antioxidantes, como 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 e Robertsen, 1993); 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) podem desempenhar papéis importantes nas respostas de defesa das plantas quando infectadas por patógenos. As ERO são consideradas tóxicas aos patógenos, assim, as enzimas relacionadas com a detoxificação das ERO desempenham papel fundamental na modulação do nível delas na planta como respostas de defesa (Delledonne et al., 2001).

2.4 Silício

O uso de silício (Si) na agricultura não é novidade, pelo contrário, o primeiro relato sobre a sua utilização na agricultura foi feito pelo cientista, agrônomo e químico alemão Justus Liebig, sugerindo-o como fertilizante em um experimento em casa-de-vegetação em 1840, mas só em 1859 ocorreu o primeiro experimento em nível de campo com fertilizante silicatado na Estação Experimental de Rothamsted, na Inglaterra.

O Si é considerado um elemento químico de grande abundância na crosta terrestre, ficando atrás apenas do oxigênio (Epstein & Bloom, 2005), varia entre 28 e 32% em massa de todo material do solo (Malavolta, 2006). Mesmo não sendo fisiologicamente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, a sua absorção traz inúmeros benefícios às plantas, como por exemplo, o controle de doenças de plantas (Epstein, 1999).

Na litosfera, o Si é considerado o mais abundante e estável elemento químico, entretanto, sob condições específicas pode ser dissolvido, absorvido e transportado

pelas plantas (Korndörfer, 2006). Os mecanismos que envolvem a absorção e o transporte de Si pelas plantas são muito complexos, dependendo não somente das espécies envolvidas, mas também do suprimento (Liang et al., 2007).

De maneira geral, o Si concentra-se nos tecidos de sustentação do caule, nas folhas e, em menores concentrações, nas raízes. Marschner (1995) afirma que o Si é pouco móvel no interior das plantas, como ocorre com as culturas do arroz, trigo e soja, concluindo que a absorção e distribuição radial de Si através das raízes de soja para os vasos do xilema são mais restritas a altas concentrações de Si, indicando um mecanismo efetivo de exclusão.

Nas folhas, o Si está envolvido com funções físicas de regulação da transpiração, uma vez que é capaz de se concentrar na epiderme, formando uma barreira mecânica à invasão de fungos e bactérias para o interior da planta dificultando, também o ataque de insetos sugadores e herbívoros (Epstein, 1994). 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).

O fornecimento de Si via adubação foliar poderia facilitar o acúmulo deste elemento na parte aérea, podendo proporcionar benefícios em função desse acúmulo. A acumulação de silício na cutícula (epiderme) também determina alterações na arquitetura das plantas de arroz, podendo ficar mais eretas, evitando o acamamento ou diminuindo o autossombreamento (Deren et al., 1994). Desta forma, a adubação complementar com Si pode, além de aumentar a produtividade, reduzir o uso e gastos com defensivos agrícolas, e conseqüentemente reduzir o impacto ambiental.

Pesquisas atuais relevam o envolvimento do Si em diferentes aspectos da vida da planta, como aspectos bioquímicos, fisiológicos, anatômicos e morfológicos, todos com papéis bastante complexos. Comprovando os inúmeros benefícios que a adubação silicatada pode oferecer às plantas, aumentando a produtividade e a qualidade do produto colhido, considera-se então, que esse elemento possa ser um nutriente agronomicamente essencial (Ferreira, 2008). Entretanto, a maioria dos produtores e

técnicos ainda desconhece os efeitos e as vantagens do uso de fontes de Si nas suas lavouras.

No caso específico do algodão, a concentração de silício na fibra de algodão aumenta durante o período de alongamento, alcançando um valor máximo na iniciação da parede secundária, sugerindo que o Si poderia ter um papel na iniciação e alongamento da fibra e, possivelmente, na iniciação secundária (Ferreira, 2008). A adubação com Si via solo promoveu um crescimento prematuro do algodão, aumentou o número total de capulhos e simpódios, tamanho de capulhos e porcentagem de fibra e fez a produção de fibra crescer em média 11,7% (Boylton et al., 1990).

2.4.1 Fontes de silício

As principais fontes de Si utilizadas nas pesquisas científicas são os metassilicatos de sódio e de potássio, o ácido silícico, todos com efeitos similares. Para pulverizações foliares no controle de doenças de algumas culturas, como roseiras, a fonte de Si mais usada é o metasilicato de potássio (Bélanger et al., 1995). Entretanto no Brasil, essa fonte é pouco disponível no mercado.

Escórias de siderurgias, como silicatos de Ca e Mg, são facilmente encontradas comercialmente no mercado, podendo ser utilizadas como corretivos de solos devido a sua basicidade, sendo as fontes mais importantes de Si. Existem outras fontes, como o termofosfatos magnesianos ou silicofosfatos de magnésio.

2.4.2 Silício nas plantas

A primeira informação sobre a relação entre a absorção de Si e o crescimento e desenvolvimento das plantas foi relatada há mais de 100 anos. Já é sabido que o Si aumenta a resistência de várias espécies de plantas às pragas, doenças e a diversos estresses tanto bióticos como abióticos (Marschner, 1995; Mitani & Ma, 2005). As principais plantas beneficiadas pelo uso do Si são aquelas pertencentes às famílias Poaceae, Equisetaceae e Cyperaceae (Epstein, 1999).

Diversos trabalhos tentam demonstrar a essencialidade do Si em plantas, mas esses falham ao descreverem o mecanismo de ação de nutriente. No entanto, a redução na resistência a fatores que causam estresses, sejam eles bióticos ou abióticos, podem ocorrer quando a concentração de ácido silícico estão abaixo da concentração crítica ou de um limite crítico. Portanto, nestas condições, se mudanças bioquímicas são

manifestadas pelas plantas de forma danosas a elas, então pode-se tentar definir a essencialidade do Si (Exley, 1998).

De acordo com Werner & Roth (1983), o Si encontra-se presente em quantidades significativas mesmo em sais minerais, água e ar altamente purificados. Por sua abundância na biosfera, fica difícil obter a comprovação da essencialidade do Si. Esse nutriente pode estimular o crescimento e o desenvolvimento de várias espécies vegetais através de diversas ações indiretas, como a redução do autossombreamento, tornando a folhagem mais ereta, diminuição da suscetibilidade ao acamamento, aumento da rigidez estrutural dos tecidos, proteção contra estresses abióticos, como decréscimo da toxidez de Fe, Al, Mn e Na, redução da incidência de patógenos e aumento da proteção contra herbívoros (Epstein, 1994; Marschner, 1995).

Os teores de Si em plantas terrestres são comparáveis aos macronutrientes, estando entre 0,1 a 10%, ficando como um constituinte mineral majoritário.

Miyake & Takahashi (1985) classificaram as plantas quanto à absorção do Si em três tipos: grupo 1 – plantas acumuladoras, com um teor bastante alto de Si, sendo a absorção estaria ligada a respiração aeróbica. Exemplos deste grupo seriam o arroz e a cana de açúcar; grupo 2 – plantas não acumuladoras, caracteriza-se por apresentar um baixo teor de Si, mesmo com elevados teores de Si no meio, indicando um mecanismo de exclusão, o tomateiro é um exemplo típico; grupo 3 – plantas intermediárias, são as que apresentam uma quantidade considerável de Si, quando a concentração do Si é alta no meio, as curcubitáceas e a soja são exemplos desse grupo, pois translocam o Si livremente das raízes para a parte aérea.

A capacidade que as plantas tem em absorver o Si é bastante diferenciada, isso pode ocorrer até mesmo em genótipos de uma mesma espécie, como já foi demonstrado para cevada (Nable et al., 1990) que apresentaram uma variação nas concentrações de Si de um fator superior a três. Resultados semelhantes foram observados em genótipos de arroz, que variaram nos teores de Si, respondendo de forma diferenciada a aplicação desse elemento (Winsow, 1992; Deren et al., 1992). Genes aditivos ou não podem estar envolvidos no mecanismo de ação do Si para cultura do arroz (Majumder et al., 1985).

2.4.3 O silício no controle das doenças

Pesquisas recentes evidenciaram o efeito do Si no controle de doenças em várias culturas, bem como no aumento da taxa fotossintética, na melhoria da arquitetura foliar

e em outros processos do metabolismo vegetal, resultando em maior qualidade dos alimentos e no aumento da produção de diversas culturas (Rodrigues et al. 2005; Datnoff et al., 2007). A melhor arquitetura das folhas permite maior penetração de luz solar, maior absorção de CO₂ e redução da transpiração excessiva, o que facilita um acréscimo da taxa fotossintética (Takahashi, 1995). Observou-se em plantas de arroz, supridas com Si obtiveram um aumento na produção e na massa individual das sementes, redução da esterilidade e do teor de Mn e uma maior taxa fotossintética (Matoh et al., 1991; Pershin et. al., 1995).

A nutrição mineral da planta pode ser considerada como um fator ambiental de fácil manipulação, tornando-se um componente essencial no controle de doenças. Vários estudos demonstram que o Si pode influenciar o grau de tolerância de cereais e dicotiledôneas ao ataque de patógenos (Marschner, 1995). Já para as monocotiledôneas, a interação entre o Si e a redução de doenças fúngicas é conhecida há bastante tempo.

O Si possibilita que a planta seja capaz de desenvolver barreiras físicas e químicas para se defender contra o ataque dos patógenos. Barreiras mecânicas incluem mudanças na anatomia, como células epidérmicas mais espessas e com um grau elevado de lignificação. O acúmulo de Si e deposição desse elemento nas células da camada epidérmica pode ser uma barreira física efetiva na penetração de hifas (Epstein, 1994; Marschner, 1995).

O uso do Si em equilíbrio com outros nutrientes, demonstrou ser uma alternativa eficiente no controle de determinadas doenças de plantas e, se for associado a fungicidas, pode aumentar a sua eficiência, como ocorreu na cultura do arroz. Em plantas suplementadas com 1.000 kg ha⁻¹ de silicato de cálcio e com a combinação de silicato e fungicida (1.000 mL de edifenphos por ha⁻¹), a severidade da *Magnaporthe grisea* reduziu em 22% e 75%, respectivamente (Seebold Jr. et al., 2004).

O Si também atua no tecido do hospedeiro afetando os sinais entre o hospedeiro e o patógeno, resultando em uma ativação mais rápida e extensiva dos mecanismos de defesa da planta (Samuel et al., 1991; Chérif et al., 1994). Vários estudos relatam seu envolvimento em inúmeros aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos, promovendo melhorias no metabolismo, ativação de genes para produção de fenóis e enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa da planta (Epstein, 1994).

Assim, objetivou-se com este estudo investigar os efeitos do Si por meio de análises fisiológicas e bioquímicas envolvidos com o aumento da resistência em plantas de algodão à mancha de ramulária.

3. Referências

- AGRIANUAL. **Informa economics**. São Paulo: FNP. 2011. 520 p.
- ANDRADE, P.M.C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Controle químico de doenças em algodão no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p.262-265, 1999.
- AQUINO, L.A.; BERGER, P. G.; RODRIGUES, F.A.; ZAMBOLIM, L.; OGOSHI, F.; MIRANDA, L.M.; LÉLIS, M.M. Controle alternativo da mancha de ramulária do algodão. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p.131-136, 2008.
- BÉLANGER, R.R.; BOWEN, P.A.; EHRET, D.L.; MENZIES, J.G. Soluble silicon – its role in crop and disease management of greenhouse crops. **Plant Disease**, v. 79, p.329-336, 1995.
- BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio de algodão no Brasil**. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília, 2008. 85 p.
- BIRCHALL, J.D.; BELLIA, J.P.; ROBERTS, N.B. On the mechanisms underlying the essentiality of silicon – interactions with aluminum and copper. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 149, p.231-240, 1996.
- BOLEK, Y.; KAMAL, M. EL-ZIK.; PEPPER, A.E.; BELL, A.A.; MAGILL, C.W.; THAXTON, P.M. & REDDY, O.U.K. Mapping of *verticilium* wilt resistance genes in cotton. **Journal Plant Science**, v. 168, p.1581-1590, 2005.
- BOYLTON, E.K.; HEBERT, J.J.; HENSARLING, T.P.; BRADOW, J.M.; THIBODEAUX, D.P. Role of silicon in developing cotton fibers. **Journal of Plant Nutrition**, v. 13, p.131-148, 1990.
- CARLISLE, E.M. Silicon as an essential element for the chick. **Science**, v. 178, p.619-621, 1972.
- CARVALHO, J.D.V. **Cultivo do algodão**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília. 2007.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO, R.S.S.; FARIA, A.Y.K. Comportamento de genótipos de algodão em relação às doenças fúngicas no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p.362-363, 2000.
- CASSETARI NETO, D.; SANTOS, E.N.; PRADE, A.G.; ZAMBENEDETTI, E.B.; LEITE, J.J.; VALCANAIÁ, E.; ARAUJO, D.V.; ANDRADE, J.R.; AVILA, W.P.; CAYE, S.; ARNHOLD, D. Avaliação de fungicidas no controle de doenças em soja no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.334-335, 2001.

CAUQUIL, J.; SÉMENT, G.L. Faux mildiou du cotonnier (*Ramularia areola* Atk.) dans le sud-ouest de Madagascar. **Coton et Fibres Tropicales**, v. 28, p.279-286, 1973.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium spp.* **Phytopathology**, v. 84, p.236-242, 1994.

CIA, E.; FUZATTO, M.G.; ALMEIDA, W.P.; RUANO, O.; KONDO, J.I.; PIZZINATTO, M. A.; CARVALHO, L.H.; ROSSETTO, R.; KASAI, F.S.; FOLTRAN, D. E. Resistência genética a doenças e nematóides em genótipos de algodão. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p.323-326, 2005.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças Do Algodoeiro (*Gossypium spp.*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 4. ed., v. 2, p.41- 52, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos safra 2010/2011**. Décimo Segundo levantamento, novembro/2011.

CURVELO, C.R.S.; RODRIGUES, F.Á.; BERGER, P.G.; REZENDE, D.C. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p.108-11, 2010.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: **Mineral Nutrition and Plant Disease**. The American Phytopathological Society. p. 233-246, 2007.

DEGRANDE, P.E. **Guia prático de controle de pragas do algodoeiro**. Dourados: Universidade Federal do Estado do Mato Grosso do Sul, 1998. 60 p.

DEREN, C.W.; DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H. Variable silicon content of rice cultivars grown on Everglades Histosols. **Journal of Plant Nutrition**, v. 15, p.2363-2368, 1992.

DEREN, C.W.; DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; MARTIN, F.G. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, v. 34, p.733-37, 1994.

EHRlich, J.; WOLF, F.A. Areolate mildew of cotton. **Phytopathology**, v. 22, p.229-240, 1932.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 91, p.11-17, 1994.

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

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2005. 380 p.

EXLEY, C.; CHAPPELL, J.S.; BIRCHALL, J.D.A. A mechanism for a cute aluminum toxicity in fish. **Journal of Theoretical Biology**, v. 151, p.417-428, 1998.

FERREIRA, S.M. O efeito do silício na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.): aspectos bioquímicos, qualidade de fibra e produtividade. 2008. 67 f. (Tese de Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo. 2008.

FREIRE, E.C. História do algodão no Cerrado. In: Freire, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**, Brasília, p. 23-61. 2011.

FUZATTO, M.G.; CIA, E.; LÜDERS, R.R. **Um método para avaliar e classificar a estabilidade de desempenho eficiente de genótipos de algodoeiro**. Campinas, SP: IAC-APTA. 2005.

HARRIS, G. Deficiência de potássio em algodão relacionada à mancha foliar. **Informações Agronômicas**, v. 96, p.1-2, 2001.

HILLOCKS, R.J. Fungal disease of the leaf. In: Hillocks, R.J. (Ed.). **Cotton diseases**. Wallington: CAB International, v. 6, p.191-238, 1992.

HOLEY, N.R.; SAPUTE, G.N.; GHODERAO, B.N.; PESHNEY, N.L. Evaluation of diploid cottons (*Gossypium species*) for resistance to grey mildew disease caused by *ramularia gossypii*. **Crop Protection**, v. 62, p.293-294, 1992.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças foliares do algodão**. 1ª ed. Jaboticabal SP. Funep. 2003. 41 p.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças do algodoeiro**. Interação patógeno-hospedeiro. Jaboticabal SP. Funep. 2007. 62 p.

KORNDÖRFER, G.H. Elementos benéficos. In: Fernandes, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.355-374, 2006.

LANZA, M.A.; FALLIERI, J.; SILVA, P.J.; FARIA, R.S. Comportamento de cultivares de algodão quanto à resistência a viroses. **Anais...** In: II Congresso Brasileiro de Algodão, p.428-430. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão. 1999.

LIANG, H.; LAI, X.; ZAHO, Y.; BAI, Y.; WANG, B.; GAO D. SPE-HPLC method for the determination of four flavonols in rat plasma and urine after oral administration of *Abelmoschus manihot* extract. **Journal of Chromatography B. Analytical Technology Biochemistry Life Science**, v. 852, p.108-114, 2007.

LUCENA, V.S. Caracterização da resistência do algodão a *Ramularia areola* e variabilidade molecular do patógeno. 2007. 115 f. (Dissertação Mestrado). Rio Grande do Norte. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2007.

MA, J.F.; TAKAHASHI, E. Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. **Elsevier Science**. 2002. 274 p.

MAJUNDER, N.D.; RAKSHIT, S.C.; BORTHAKUR, D.N. Genetics of silica uptake in selected genotypes of rice (*O. sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 88, p.449-453, 1985.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. 2. ed. São Paulo: Ceres. 2006. 638 p.

MARANHA, F.G.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FARIAS, F.J.C. Estratégias de análise da reação de cultivares de algodão a patógenos. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, p.565-575, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. New York: Academic Press, 1995. 887p.

MATOH, T.; MURATA, S.; TAKAHASHI, E. Effect of silicate application on photosynthesis of Rice plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 63, p.248-251, 1991.

MEHTA, Y.R.; MENTEN, J.O.M. **Doenças e seu controle**. In: MORESCO, E. (org). Algodão – Pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá MT. FACUAL. v. 2, p.157-205, 2006.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth of solution cultured cucumber plants. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 29, p.71-83, 1985.

MUKEWAR, P.M.; MAYEE, C.D. Grey mildew immune cotton germplasm lines registred. **Indian Phytopathology**, v. 54, p.141-142, 2001.

MUKEWAR, P.M.; SHEO, R.; SINGH, V.V.; ANAP, G.R. Screening of tree cotton (*Gossypium arboreum*) germplam to grey mildew caused by *Ramularia areola*. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 65, p.298-300, 1995.

NABLE, R.O.; LANCE, R.C.M.; CARTWRIGHT, B. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. **Annals of Botany**, v. 66, p.83-90, 1990.

NOGUEIRA JUNIOR, S.; BARBOSA, M.Z. O papel da pesquisa e a importância do cerrado para a reorganização da cotonicultura brasileira. **Agrícola**, v. 52, p.87-98, 2005.

PAIVA, F.A. Doenças. In: Embrapa Agropecuária do Oeste. **Algodão: tecnologia de produção**. Embrapa Algodão, p. 245-266. 2001.

- PERSHIN, B.M.; PERSHINA, A.N.; EGORINA, L.M. Silicon and rice production in the Primorskii region. **Agrokhimiya**, v. 10, p.68-74, 1995.
- RATHAIAH, Y. Reaction of cotton species and cultivars to four isolates of *Ramularia areola*. **Phytopathology**, v. 66, p.1007-1009, 1976.
- RATHAIAH, Y. Spore germination and mode of cotton infection by *Ramularia areola*. **Phytopathology**, v. 67, p.351-357, 1977.
- RAVEN, J.A. The transport and function of silicon in plants. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 58, p.179-207, 1983.
- RODRIGUES, F.A.; JURICK, W.M.; DATNOFF L.E.; JONES J.B.; ROLLINS J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p.144-159, 2005.
- SAMUEL, A.L.; GLASS, A.D.M.; EHRET, D.L.; MENZIES, J.G. Distribution of silicon in cucumber leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p.140-146, 1991.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p.7-12, 1993.
- SCHWARZ, K.; MILNE, D.B. Growth promoting effects of silicon in rats. **Nature**, v. 239, p.333-334, 1972.
- SEEBOLD, K.W.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, F.J.; KUCHARREK, T.A.; SNYDER, G.H. Effects of silicon and fungicides on the control of leaf and rack blast in upland rice. **Plant Disease**, v. 88, p.253-258, 2004.
- SHIA, S.Y.; WANG, Q.S. Studies on the effect of silicon fertilizer on cotton. **China Cotton**, v. 25, p.6-7, 1998.
- SHIVANKAR, S.K.; WANGIKAR, P.D. Estimation of crop losses due to grey mildew disease of cotton caused by *Ramularia areola*. **Indian Phytopathology**, v. 45, p.74-76, 1992.
- SILVA, R.R.; THEODORO, G.F.; STAUDT, R.C. Avaliação da incidência de doenças em algodoeiros cultivados na região de chapadão do Sul. **Revista Brasileira Oleaginosas e Fibrosas**, v. 14, p.91-95, 2010.
- SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**, Brasília, p. 567-612, 2011.

- SUASSUNA, N.D.; IAMAMOTO, M.M. Controle químico de *Ramularia* do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*, L.). **Anais...** In: Congresso Brasileiro do Algodão, Salvador, BA. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão. 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 843 p.
- TAKAHASHI, E. Uptake mode and physiological functions of silica. In: MATSUO, KUMAZAWA, T.; ISHII, K.; ISHIHARA, R.; HIRATA, K.H. (Ed.). **Science of the rice plant: physiology**, Food and Agriculture Policy Research Center, p.420-433, 1995.
- UTIAMADA, C.M.; LOPES, J.C.; SATO, L.N.; ROIM, F.L.B.; KAJIHARA, L.; OCCHIENA, E.M. Controle químico da ramularia (*Ramularia areola*) e ferrugem (*Phakopsora gossypii*) na cultura do algodoeiro. **Anais...** In: Congresso Brasileiro de Algodão, Goiânia. Algodão, um mercado em evolução – Campina Grande: Embrapa Algodão. 2003.
- WERNER, D. Silicate metabolism. In: WERNER, D. (Ed.). **The biology of diatoms**. Oxford: Blackwell Scientific, p.110-149, 1977.
- WERNER, D.; ROTH, R. Silica metabolism. In: LAUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. New Series. Berlin: Springer-Verlag, v. 15, p.682-694, 1983.
- WINLSOW, M.D. Silicon, disease resistance and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. **Crop Science**, v. 32, p.1208-1213, 1992.

CAPÍTULO 1

Aspectos Bioquímicos da Resistência do Algodão à Mancha de Ramulária Mediada pelo Silício

Resumo

Esse estudo investigou o efeito do silício (Si) na resistência do algodão a mancha de ramulária, causada por *Ramularia areola*. Plantas de algodão das cultivares NuOpal (suscetível) e BRS Buriti (moderadamente resistente) foram cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) Si. Avaliou-se o período de incubação (PI), o período latente (PL₆₀), a severidade (S), o número de lesões por cm² de área foliar (NL), tamanho de lesão (TL), a concentração foliar de Si e as atividades das enzimas de defesa peroxidases (POX), polifenoxidasas (PFO), quitinasas (QUI), β -1,3-glicanasas (GLI) e da fenilalanina amônia-liases (FAL). Os dados de severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva de progresso da mancha de ramulária (AACPMR). A concentração foliar de Si aumentou em 64% nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. Houve aumentos de 10% e 14,7% para o PI e PL₆₀, respectivamente, nas plantas do tratamento +Si. Reduções de 38,6% e 62,4% para o NL e de 17,2% e 26,6% para TL ocorreram nas plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti, respectivamente, quando supridas com Si. Houve redução de 35% na AACPMR para o tratamento +Si em relação ao tratamento - Si. A concentração dos compostos fenólicos solúveis totais nas plantas das duas cultivares supridas com Si aumentou durante o progresso da mancha de ramulária, porém com valores inferiores aos obtidos para as plantas não supridas com Si até os 18 dias após a inoculação (dai). Aumento na concentração de derivados de lignina foi significativo apenas para as plantas da cultivar BRS Buriti infectadas por *R. areola* e supridas com Si. A atividade da POX foi maior nas plantas das duas cultivares supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. Para as plantas da cultivar NuOpal supridas com Si, as atividades das PFO, QUI, GLI e FAL aumentaram aos 18 dai, porém as atividades das PFO e da FAL nas plantas da cultivar BRS Buriti não foram potencializadas pelo Si. Nas plantas da cultivar BRS Buriti supridas com Si, houve aumento nas atividades da QUI e da GLI aos 21 dai em relação as plantas não supridas com Si. Conclui-se que a resistência do algodão à mancha de ramulária foi bioquimicamente potencializada pelo Si, principalmente para as plantas da cultivar NuOpal considerada suscetível a mancha de ramulária.

1. Introdução

A mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* (Atk.), é considerada uma das principais doenças foliares do algodão na região centro-oeste do Brasil e ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de algodão (Suassuna & Coutinho, 2011). A mancha de ramulária pode ocasionar perdas de até 50% quando medidas de controle não são adotadas de maneira eficaz (Aquino et al., 2008). 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 essa doença (Andrade et al., 1999).

Durante a infecção por patógenos, as plantas podem ativar inúmeros mecanismos de defesa, tais como a produção de natureza antimicrobiana e a transcrição de genes associados com a resistência (Rodrigues et al., 2005). Desta forma, a potencialização dos mecanismos de defesa das plantas surge como uma estratégia para minimizar os danos causados pelos patógenos (Epstein, 1999; Datnoff et al., 2007). O uso de silício (Si) é uma medida alternativa de controle, com resultados promissores. Na cultura do arroz, o Si é absorvido a níveis que ultrapassam os macronutrientes (Epstein, 1999), o que permite uma aceitação maior pelos produtores, por resultar na redução da intensidade de várias doenças, favorecendo o seu uso inclusive em outras culturas, como o pimentão, tomate, roseira e banana (French-Monar et al., 2010; Huang et al., 2011; Shetty et al., 2011; Vermiere et al., 2011).

Informações a respeito do efeito de potencializadores de resistência, como por exemplo, o Si, na atividade das enzimas de defesa como as POX, responsáveis pelo reforço da parede celular através da deposição de lignina; POF, que oxidam compostos fenólicos a moléculas mais reativas; QUI e GLI que degradam a parede celular de espécies fúngicas e a FAL envolvida na rota dos fenilpropanóides (Xu et al., 1998) ainda são incipientes na interação algodão-*R. areola*. Todavia, em diversos estudos relata-se que o Si potencializa mecanismos de defesa das plantas com o aumento na produção de compostos fenólicos, na concentração de fitoalexinas e também na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a patogênese (Datnoff et al., 2007; Rodrigues et al., 2005). O incremento na atividade de enzimas líticas à parede celular fúngica ou associadas com o metabolismo secundário da planta também reforçam a hipótese de que o Si potencializa mecanismos de defesa em plantas e não atua apenas de forma passiva na resistência (Liang et al., 2005). Assim, o presente

estudo tenta também reforçar essa hipótese através de análises bioquímicas sobre as enzimas de defesa das plantas.

Este trabalho objetivou investigar o efeito do Si na resistência do algodão à mancha de ramulária e os aspectos bioquímicos possivelmente envolvidos com o aumento da resistência.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão

A solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e foi constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca₂(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 e 45 µM EDTA bisódico. O Si, fornecido como ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio através da resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, H⁺ forma, Sigma-Aldrich, São Paulo) (Ma et al., 2002). As concentrações de Si utilizadas foram de 0 e 2 mM. A adição do ácido monossilícico à solução nutritiva não alterou o seu pH.

Sementes de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% por 2 min e, posteriormente, lavadas 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. As plântulas foram mantidas em solução nutritiva com meia força iônica contendo ou não ácido monossilícico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido a 5,5 e 6,0 empregando soluções de NaOH ou HCl (1 M) quando necessário. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Obtenção e preparo do inóculo de *R. areola* e inoculação das plantas de algodão

Folhas de plantas de algodão da cultivar NuOpal cultivadas no campo experimental Prof. Diogo Alves de Melo da UFV e apresentando sintomas da mancha de ramulária foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e trazidas para o Laboratório da Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitopatologia da UFV. O inóculo foi preparado lavando as folhas em água destilada contendo gelatina (1% p/v) com o auxílio de um pincel de cerdas macias para uma melhor remoção dos conídios. Posteriormente, a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze estéril para a retirada de possíveis impurezas e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios/mL com o auxílio de um hemacitômetro.

Plantas de algodão no estágio V4 (30 dias após a emergência) (Marur & Ruano, 2001) foram inoculadas com a suspensão de conídios de *R. areola* com o auxílio de um atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, EUA) cobrindo homogeneamente as superfícies abaxial e adaxial das folhas. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $\pm 90\%$) por 48 h e, em seguida, transferidas para câmaras de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de $50 \pm 5\%$ pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da UFV. As plantas permaneceram nessas câmaras até o final do experimento.

2.3 Avaliação de componentes de resistência do hospedeiro e da severidade da mancha de ramulária

Foram avaliados o período de incubação (PI), o período latente (PL₆₀), o número de lesões por cm² de área foliar (NL), o tamanho de lesão (TL) em quatro folhas marcadas com cordões de lã de diferentes cores em cada uma das plantas das repetições de cada tratamento. O PI foi avaliado a cada 24 h a partir dos 8 dai. O PL₆₀ ocorreu quando 60% das dez lesões marcadas apresentaram esporulação. A severidade da mancha de ramulária nas plantas de algodão foi avaliada a partir do 12º dai utilizando-se a escala diagramática proposta por Aquino et al. (2008). Os dados da severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) através da integração trapezoidal das curvas de progresso da doença de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977). Após as avaliações da

severidade, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, digitalizadas na resolução de 400 dpi e as imagens processadas no software QUANT (Liberato, 2003) utilizando-se o procedimento de redução de cores por paleta. Os valores obtidos neste procedimento foram utilizados para quantificar o NL e o TL.

2.4 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG)

Amostras de folhas das plantas foram coletadas aos 12,15,18 e 21 dai. Amostras de folhas das plantas não inoculadas com *R. areola* (0 h) serviram como uma referência. As amostras foram coletadas em nitrogênio (N₂) líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até análise. Uma amostra representativa de 0,1 g de tecido foliar da repetição de cada tratamento foi macerada em almofariz e pistilo contendo N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga e homogeneizado com 1,5 mL de metanol a 80%. O extrato permaneceu por 12 h em mesa agitadora a 200 rpm em temperatura ambiente. O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 × g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e usado para a determinação da concentração de CFST. O resíduo foi mantido a -20 °C para determinação dos derivados da LATG. O método desenvolvido por Zieslin & Ben-Zaken (1993) com algumas modificações foi usado para determinar a concentração de CFST. Um volume de 150 µL do reagente Fenol Folin-Ciocalteu 0,25 N (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi adicionado a 150 µL do extrato metanólico e mantido à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 150 µL de carbonato de sódio (1 M) foi adicionado à mistura, seguida de agitação e mantida em temperatura ambiente por 10 min. Logo após, 1 mL de água destilada foi adicionada à mistura que foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 1 h. Foi determinada a absorbância da mistura em uma amostra de 500 µL para a repetição de cada tratamento a 725 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de CFST foi expressa em mg de compostos fenólicos (em termos de catecol) por g de massa fresca foliar. Durante todo o processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz.

Um volume de 1,5 mL de água estéril destilada foi adicionado ao resíduo obtido após a extração dos CFST. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco por 12 h a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi usado para determinar lignina de acordo com o método de Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e HCl a 2 N (1:10) foi adicionado ao resíduo seco. Os tubos de microcentrífuga foram levemente agitados para hidratar o resíduo e depois colocados em banho-maria a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h. Posteriormente, os tubos de microcentrífuga foram colocados em gelo ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a $12000 \times g$ por 10 min sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada esterilizada e centrifugado novamente a $10.000 \times g$ por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaOH a 0,5 N. A mistura permaneceu por 12 h em mesa agitadora (150 rpm) em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Posteriormente, foram adicionados 200 μL de HCl concentrado ao sobrenadante e os tubos de microcentrífuga foram transferidos para geladeira ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) por 4 h para precipitação dos derivados da LATG. Uma nova centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min foi realizada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (castanho-alaranjado) foi dissolvido em 2 mL de NaOH a 0,5 N. A absorbância dos derivados da LATG no sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 280 nm (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e a concentração foi expressa em mg kg^{-1} de massa fresca foliar. Lignina alcalina éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, São Paulo) foi usada para a obtenção de uma curva padrão.

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 12, 15, 18, 21 dai. Folhas coletadas de plantas não inoculadas (0 h) com *R. areola* serviram como uma referência. As folhas foram mantidas em N_2 líquido durante a coleta e armazenadas em ultrafreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até serem analisadas.

2.5.1 Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,4 g de folhas em N₂ líquido em almofariz 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 absorvância foram realizadas a 420 nm a cada 10 seg durante 1 min em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA EUA). A atividade da POX foi determinada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) e expressa em mmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5.2 Atividade de polifenoxidases (PFO, EC 1.10.3.1)

O extrato enzimático foi semelhante ao obtido para determinação da PFO. A atividade da PFO 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 absorvância foram realizadas a 420 nm a cada 10 seg durante 1 min em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade da PFO foi determinada 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 quitinases (QUI, EC 3.2.1.14)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,4 g de folhas em N₂ líquido em almofariz 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 realizada de acordo com a metodologia proposta por Roberts & Selitrennikoff (1988), modificada por Harman et al. (1993), utilizando-se como substrato o *p*-nitrofenil-β-D-N-N'-diacetilquitobiose (PNP) (Sigma-Aldrich, São Paulo). O meio de reação contendo 470 μL de 50 mM tampão acetato de sódio (pH 5,0), 10 μL de PNP (2 mg/mL) e 20 μL do extrato vegetal foi incubado a 37 °C por 2 h. A reação foi paralizada acrescentando-se 500 μL de 50 mM acetato de sódio (pH 5,0). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 410 nm imediatamente após as reações serem paralizadas. Foi utilizado para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 7 M⁻¹ cm⁻¹ e a atividade da QUI foi expressa em mmol de *p*-nitrofenil produzido por min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

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

O extrato enzimático foi semelhante ao obtido para determinação da 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 foi 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 suas absorbâncias determinadas em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 540 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.5.5 Atividade de fenilalanina amônia-liases (FAL, EC 4.3.1.5)

Para a obtenção do extrato enzimático usado na determinação da atividade da FAL, 0,4 g de tecido foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz com adição de PVP (2%) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão borato de sódio 0,05 M (pH 8,3) contendo β -mercaptoetanol (5 mM) e EDTA (1 mM). A mistura foi centrifugada duas vezes a $7.000 \times g$ por 15 min. Os sobrenadantes foram usados como substrato para determinar a atividade da FAL. A reação foi iniciada após a adição de 0,5 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de 0,1 M tampão borato de sódio (pH 8,8) e 1 mL 20 mM de *L*-fenilalanina. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C durante 1 h. Nas amostras controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão borato de sódio. A reação foi finalizada após adição de 0,1 mL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zucker, 1965) foi usado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

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

2.6 Determinação da concentração foliar de Si

Após o término do experimento, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C durante 72h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 40 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica da digestão alcalina de 0,1 g de massa seca foliar (Korndörfer et al., 2004).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

Foram conduzidos dois experimentos sendo o primeiro (Exp. 1) para avaliar os componentes de resistência e a severidade da mancha de ramulária e o segundo (Exp. 2)

para obter as amostras para as determinações bioquímicas. Os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado num esquema fatorial 2×2 , sendo seis e quatro repetições para Exp. 1 e o Exp. 2, respectivamente. Os fatores estudados foram: duas cultivares de algodão e duas doses de Si. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas de algodão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de Tukey ou test-*t* ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAEG 9.1 (Universidade Federal de Viçosa, 2007). A concentração foliar de Si foi correlacionada com os componentes de resistência e com a AACPMR.

3. Resultados

3.1 Componentes de resistência, AACPMR e concentração foliar de Si

Houve efeito significativo do fator doses de Si para o PI, PL₆₀, AACPMR e concentração foliar de Si (Tabela 1) e da interação doses de Si \times cultivares para o NL e o TL (Tabela 2). Houve aumento de 10 e 14,7% para o PI e PL₆₀, respectivamente, e redução de 35% na AACPMR nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1). A concentração foliar de Si aumentou em 64% nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1). O NL foi reduzido em 26,6 e 62,4 e o TL em 17,2 e 38,6% nas plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti, respectivamente, supridas com Si.

3.2 Correlação de Pearson

A correlação entre a concentração foliar de Si com o PI e o PL₆₀ foi significativa e positiva ($r = 0,39$ e $0,67$ respectivamente; $P \leq 0,01$) e significativa e negativa para a AACPMR, NL e TL ($r = -0,52$; $-0,65$ e $-0,78$, respectivamente; $P \leq 0,01$).

3.3 Concentrações de CFST e derivados da LATG

A concentração de CFST aumentou significativamente em 12 e 8% apenas aos 18 dai nas plantas das duas cultivares não supridas com Si e inoculadas com *R. areola* (Fig.

1A e B). Já nas plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti supridas com Si, houve aumentos significativos de 11% e 12% somente aos 21 dai, respectivamente (Fig 1A e B). Diferenças significativas entre as plantas supridas ou não com Si ocorreram para as plantas da cultivar BRS Buriti não-inoculadas com *R. areola* apenas aos 0 dai (Fig. 1B).

A concentração de derivados da LATG foi significativamente maior nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si apenas aos 0 dai com aumento de 31% em relação as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 2A). As plantas não supridas com Si apresentaram aumento significativo de 11% na concentração de derivados da LATG somente aos 15 dai em comparação com as plantas supridas com Si (Fig. 2A). Houve aumento significativo na concentração de derivados da LATG nas plantas da cultivar BRS Buriti supridas com Si aos 15, 18 e 21 dai de 16, 21 e 24%, respectivamente, em comparação com as concentrações obtidas nas plantas não supridas com esse elemento (Fig. 2B).

3.4 Atividades das enzimas POX, PFO, QUI, GLI e FAL

A atividade da POX aumentou significativamente nas plantas das duas cultivares supridas com Si e inoculadas com *R. areola* aos 15, 18 e 21 dai em relação as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 3A e B). Diferenças significativas entre as plantas da cultivar NuOpal supridas ou não com Si e não-inoculadas com *R. areola* ocorreu somente aos 0 dai (Fig. 3A).

A atividade da PFO nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si e inoculadas com *R. areola* aumentou significativamente apenas aos 18 dai (Fig. 4A). Houve aumentos significativos na atividade da PFO nas plantas da cultivar BRS Buriti não supridas com Si e inoculadas com *R. areola* apenas aos 21 dai em relação às plantas supridas com Si (Fig. 4B). Diferenças significativas entre as plantas da cultivar BRS Buriti supridas ou não com Si e não-inoculadas com *R. areola* ocorreu apenas aos 0 dai (Fig. 4B).

Houve aumento significativo na atividade da QUI nas plantas das duas cultivares não supridas com Si somente aos 15 dai (Fig. 5A e B). A atividade da QUI aumentou significativamente nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si aos 18 e 21dai em relação as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 5A). Diferenças significativas entre as plantas da cultivar NuOpal supridas ou não com Si e não-inoculadas com *R.*

areola ocorreu somente aos 0 dai (Fig. 5A). Houve aumento significativo na atividade da QUI nas plantas da cultivar BRS Buriti supridas com Si apenas aos 21 dai em comparação com as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 5B).

A atividade da GLI aumentou significativamente nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si aos 18 e 21 dai (Fig. 6A). Diferenças significativas entre as plantas da cultivar NuOpal supridas ou não com Si e não-inoculadas com *R. areola* ocorreu apenas aos 0 dai (Fig. 6A). Houve aumento significativo na atividade da GLI nas plantas da cultivar BRS Buriti supridas com Si apenas aos 21 dai quando comparadas com as plantas não supridas com Si (Fig. 6B).

Houve aumentos significativos na atividade da FAL nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si aos 18 e 21 dai (Fig. 7A). Diferenças significativas entre as plantas da cultivar NuOpal supridas ou não com Si e não inoculadas com *R. areola* ocorreu apenas aos 0 dai (Fig. 7A). A atividade da FAL nas plantas da cultivar BRS Buriti não supridas com Si e inoculadas com *R. areola* aumentou significativamente aos 15 e 18 dai em relação às plantas supridas com Si (Fig. 7B).

4. Discussão

Este estudo apresenta as primeiras informações sobre as respostas bioquímicas de defesa do algodão à infecção por *R. areola* potencializadas pelo Si. O Si influenciou significativamente na diminuição da AACPMR nas folhas das plantas nas duas cultivares de modo semelhante aos resultados obtidos na redução de doenças em outras culturas de importância econômica, como arroz, milho, soja, sorgo e trigo (Bélangier et al., 2003; Datnoff et al., 2007; Dallagnol et al., 2009; Rodrigues et al., 2009). A área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) fornece informações quantitativas do efeito da resistência do hospedeiro em reduzir a intensidade da doença (Jeger & Riollinson, 2001).

A concentração de Si nas folhas das plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti supridas com esse elemento foram pequenas, porém causaram impacto negativo no desenvolvimento da mancha de ramulária. Isso sugere que mesmo em pequenas concentrações de Si, as plantas de algodão são eficientes na absorção e acumulação desse elemento em seus tecidos. Os resultados obtidos neste estudo foram inferiores aos encontrados em arroz, cana-de-açúcar e outras gramíneas, reconhecidas como

acumuladoras de Si e que chegam a apresentar até 5% de Si na matéria seca da parte aérea (Datnoff et al., 2007). Nolla et al. (2006) e Rodrigues et al. (2009) encontraram teores foliares de Si variando de 0,34 a 0,55% e de 0,67 a 0,73% em plantas de soja cultivadas em solo deficiente nesse elemento que recebeu a aplicação de silicato de cálcio e de potássio, respectivamente. Os resultados obtidos por esses autores foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho. Contrariamente, em outro estudo, a soja demonstrou ser uma espécie ineficiente em absorver o Si, contido no silicato de potássio aplicado via foliar, apresentando teores semelhantes aos de outras espécies de plantas reconhecidas como não acumuladoras de Si, a exemplo do tomateiro (Ma & Takahashi, 2002). Por isso, já é registrado na literatura que diversas espécies de plantas diferem quanto à capacidade em absorver o Si da solução do solo e translocá-lo, de forma eficiente, para a parte aérea (Ma & Takahashi, 2002).

O PI e PL₆₀ aumentaram com o fornecimento de Si para as plantas das duas cultivares. Resultados semelhantes também foram observados por Resende et al. (2009) onde a aplicação de silicato de cálcio no solo aumentou o período de incubação e o período latente da antracnose nas folhas de sorgo, respectivamente, 13% e 24% em relação às plantas não supridas com esse elemento. Portanto, aumentos consideráveis no PI resultarão em uma menor taxa de progresso da doença (r) diminuindo, assim, o número de ciclos secundários dos patógenos de espécies vegetais (Parlevliet, 1979). Shetty et al. (2011) também observaram que as plantas de roseira supridas com Si tiveram um atraso no desenvolvimento dos sintomas e redução na severidade do míldio pulverulento.

Nas plantas supridas com Si das duas cultivares houve redução no NL e no TL. Resultados semelhantes foram observados por Xavier Filha et al. (2011), estudando a brusone em plantas de trigo que constataram aumentos no período de incubação e reduções na AACPB e no número de lesões por cm² de área foliar para o tratamento com Si. De forma similar, estudo realizado por Domiciano et al. (2010) para avaliar alguns componentes de resistência em plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana* e supridas com Si foi observado aumento no período de incubação e reduções na AACPM e no número de lesões por cm² de área foliar.

Rodrigues et al. (2005) relatam que a aplicação de Si pode influenciar na produção de compostos fenólicos em plantas infectadas por patógenos. A concentração de CFST encontrada nesse estudo não esclarece a influência do Si em potencializar resistência às plantas de algodão à mancha de ramulária, pois as plantas não supridas

com esse elemento obtiveram concentrações superiores as plantas supridas com Si, porém, mesmo em concentrações inferiores, as plantas supridas com Si foram eficientes em aumentar a resistência das plantas das duas cultivares de algodão. Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo foram observados por Dominicano et al. (2010) e Xavier Filha et al. (2011) em que os autores obtiveram valores inferiores na concentração de CFST das plantas de trigo supridas com Si. Entretanto, esses foram suficientes para reduzir a AACPM e AACPB da mancha marrom e brusone, respectivamente.

A lignina associada à hemicelulose por ligações com diversos polissacarídeos de espécies vegetais pode conferir resistência mecânica à parede celular e afetar várias enzimas líticas produzidas pelos diferentes patógenos durante a colonização do tecido do hospedeiro (Chabannes et al., 2001). A concentração de derivados de lignina aumentou após o início da infecção pela *R. areola*, estando diretamente associada com o incremento na resistência das plantas supridas com Si da cultivar BRS Buriti. No entanto, para as plantas da cultivar NuOpal, a concentração dos derivados da LATG não foi influenciada pelo Si em plantas supridas com esse elemento. Nesse contexto, o Si poderia estar associado à lignificação da parede celular e não à produção de compostos fenólicos, pelo menos para as plantas da cultivar BRS Buriti. Resultados semelhantes a esse estudo foram obtidos por Rodrigues et al. (2005), que observaram que o acúmulo de LATG foi menor em folhas de plantas de arroz supridas com Si e inoculadas com *P. grisea*, para as plantas da cultivar M201, considerada suscetível.

No que se refere à ativação das respostas bioquímicas das plantas de algodão em defesa à infecção por *R. areola* através de distintas alterações nos níveis enzimáticos, pode-se notar que as enzimas POX, PFO, QUI, GLI e FAL tiveram suas atividades aumentadas, quando as plantas foram inoculadas e supridas com Si para a cultivar NuOpal. Esses resultados foram semelhantes com a alguns estudos que investigaram as alterações das enzimas (Domiciano et al., 2010; Dallagnol et al., 2011).

As POX estão presentes em diversos compartimentos celulares, catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, lignificação de parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997). O aumento das POX tem sido relacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações patógenos-hospedeiros (Mohammadi & Kazemi, 2002). A atividade da POX foi maior nas folhas das plantas supridas com Si para as duas cultivares avaliadas. Os resultados obtidos nesse estudo se assemelham aos

observados por Chérif et al. (1994) e Dallagnol et al. (2011) que relataram aumento na atividade da POX nas plantas supridas com Si nos patossistemas, pepino – *Pythium* spp e arroz - *Bipolaris oryzae*, respectivamente. A PFO exerce papel importante na defesa das plantas, pois à medida que ocorre uma ruptura da célula, ocasionada pela ação de patógenos, ocorre o processo de oxidação dos compostos fenólicos em quinonas, as quais são tóxicas aos patógenos apresentando ação antimicrobiana (Liu et al., 2005). Assim, podem se ligar às proteínas e carboidratos produzindo compostos que atuam com barreira física aos patógenos (Abdel-Aal et al., 2001, Jung et al., 2004). Neste estudo, a atividade da PFO aumentou significativamente somente aos 18 daí, apenas para as plantas inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal.

A atividade das enzimas GLI e QUI aumentou significativamente aos 21 dai para as plantas supridas com Si das duas cultivares. A atividade dessas enzimas é influenciada pela infecção de patógenos ou produtos químicos exógenos (Kim & Hwang, 1994). Elas catalisam a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos como a quitina e a β -1,3-glucano, respectivamente. Durante o processo infeccioso, ocorre um pronunciado aumento na atividade dessas enzimas o que proporciona uma redução no crescimento e desenvolvimento dos fungos e a liberação de elicitores que induzem a produção de fitoalexinas (Keen & Yoshikawa, 1983; Hartleb et al., 1997). Os resultados desse estudo são similares aos obtidos por Domiciano et al. (2010) que mostraram que a atividade da QUI foi maior nos estádios mais avançados de infecção por *B. sorokiniana* nas folhas de duas cultivares de trigo supridas com Si. Estudos envolvendo a resistência sistêmica adquirida à *C. lindemuthianum* utilizando indutores abióticos mostram uma maior atividade da GLI do que da QUI (Kunh & Pascholati, 2010; Campos et al., 2009). Desse modo, pode-se sugerir que a atividade das enzimas QUI e GLI estaria associada com os mecanismos de defesa das plantas supridas com Si da cultivar NuOpal, impedindo que o patógeno penetre e colonize as células do tecido foliar do algodão.

A FAL é muito importante no metabolismo secundário das plantas, promovendo a primeira etapa enzimática que converte a *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, que é o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores. Posteriormente, ocorre a síntese de um grande número de compostos fenólicos e fitoalexinas (Ritter & Schulz, 2004). A atividade de FAL foi maior nas plantas inoculadas e supridas com Si apenas para a cultivar NuOpal. Resultados semelhantes ao desse estudo foram obtidos por Charakbarty et al. (2009) que

identificaram em plantas da espécie *Gossipium arboreum*, com 5 a 10% da área foliar afetada pela mancha de ramulária uma maior atividade da enzima FAL, quando comparado com folhas de plantas saudáveis. Rodrigues et al. (2003) também observaram que plantas supridas com Si produziram maior quantidade de fitoalexinas em resposta à infecção por *P. grisea* do que nas plantas não supridas com Si.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que em plantas supridas com Si e infectadas por *R. areola* houve aumento da resistência nas plantas de algodão à mancha de ramulária, devido à maior produção de lignina para as plantas da cultivar BRS Buriti. Houve também aumento na atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLI e FAL para as plantas da cultivar NuOpal, e das enzimas POX, QUI, GLI para as plantas da cultivar BRS Buriti em estádios mais avançados da infecção por *R. areola*. Vale ressaltar que essa última cultivar apresenta um nível moderado de resistência à mancha de ramulária. Porém, mesmo com certo nível de resistência, essa não foi potencializada pelo Si no que se refere à atividade das enzimas PFO e FAL. Talvez existam outros mecanismos que possam estar envolvidos na resistência do algodão à mancha de ramulária que não foram estudados neste estudo.

5. Referências

- ABDEL-AAL, E.S.M.; HUCL, P.; SOSULSKI F.W.; GRAF, R.; GILLOTT, C.; PIETRZAK L. Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.3559-3566, 2001.
- AQUINO, L.A.; BERGER, P.G.; RODRIGUES, F.A.; ZAMBOLIM, L.; HERNANDEZ, J.F.R.; MIRANDA, L.M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramularia do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p.361-363, 2008.
- ANDRADE, P.M.C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. (1999). Controle químico de doenças em algodão no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 262-265, 1999.
- BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; MENZIES, J.G. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). **Phytopathology**, v. 93, p.402-412, 2003.
- CAMPOS, A.D.; HAMPE, M.M.V.; FERREIRA, A.G.; ANTUNES, I.F.; CASTRO, L.A. Indução de resistência à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta

de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.15-21, 2009.

CHABANNES, M.; RUEL, K.; YOSHINAGA, A. *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. **Plant Journal**, v. 28, p.271-82, 2001.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p.764-775, 1955.

CHARAKBARTY, P.K.; MUKEWAR, P.M.; RAJ, S.; KUMAR, V.S. Biochemical factors governing resistance in diploid cotton against grey mildew. **Indian Phytopathology**, v. 55, p.140-146, 2009.

CHÉRIF, M.; ASSELIM, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 84, p.236-242, 1994.

DALLAGNOL, L.J.; RODRIGUES, F.A.; DAMATTA, F.M.; MIELLI, M.V.B.; PEREIRA, S.C. Deficiency in silicon uptake affects cytological, Physiological, and Biochemical Events in the Rice-*Bipolaris oryzae* Interaction. **Phytopathology**, v. 10, p.92-104, 2011.

DALLAGNOL, L.J.; RODRIGUES, F.A.; MIELLI, M.V.B.; MA, J.; DATNOFF, L.E. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology**, v. 99, p.116-121, 2009.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: **Mineral Nutrition and Plant Disease**. The American Phytopathological Society. p. 233-246, 2007.

DOMICIANO, G.P.; RODRIGUES, F.A.; VALE, F.X.R.; XAVIER FILHA, M.S.; MOREIRA, W.R.; ANDRADE, C.C.L.; PEREIRA, S.C. Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. **Journal Phytopathology**, v. 158, p.334-343, 2010.

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

FRENCH-MONAR, R.D.; RODRIGUES, F.A.; KORNDÖRFER, G.H.; DATNOFF, L.E. Silicon suppresses *Phytophthora blight* development on bell pepper. **Journal Phytopathology**, v. 158, p.554-560, 2010.

HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; LORITO, M.; BROADWAY, R.M.; PIETRO, A.D.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*:

purification of QUIitobiosidase and endoQUIitinase. **Phytopathology**, v. 83, p.313-318, 1993.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Germany: Fischer. 1997.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Cir. 32. 1950.

HUANG, C.H.; ROBERTS, P.D.; DATNOFF, L.E. Silicon suppresses *Fusarium* crown and root rot of tomato. **Journal Phytopathology**, v. 159, p.546–554, 2011.

JEGER, M.J.; VILJANEN-ROLLINSON, S.L.H. The use of the area under the disease progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p.32-40, 2001.

JUNG, W.J.; JIN, Y.L.; KIM, Y.C.; KIM, K.Y.; PARK, R.D.; KIM, T.H. Inoculation of *paenibacillus illiionisensis* alleviates root mortality, activates of lignifications related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, v. 30, p.645-652, 2004.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315-319, 1976.

KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiology**, v. 71, p.460-465, 1983.

KIM, Y.J.; HWANG, B.K. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. **Plant Physiology**, v. 45, p.195-209, 1994.

KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; NOLLA, O.A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia, MG, Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia, 2004. 34p.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus*. **Summa Phytopathology**, v. 36, p.107-114, 2010.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p.1237-1245, 1997.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, p.273-279, 1972.

- LIANG, Y.C.; SUN, W.C.; SI, J.; RÖMHELD, V. Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant Pathology**, v. 54, p.678-685, 2005.
- LIBERATO, J.R. Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 2003.
- LIU, H.; JIANG, W.; BI, Y.; LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p.263-269, 2005.
- MA, J.F.; TAMAI, K.; ICHI, M.; WU, G.F. A rice mutant defective in Si uptake. **Plant Physiology**, v. 130, p.2111-2117, 2002.
- MARRUR, C.J.; RUANO, O. A reference system of determination of cotton plant development. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 5, p.313-317, 2001.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, n.4, p.491-498, 2002.
- NOLLA, A.; KORNDÖRFER, G.H.; COELHO, L. Efficiency of calcium silicate and carbonate in soybean disease control. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p.2049-2061, 2006.
- PARLEVLIT, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review Phytopathology**, v. 17, p.203-222, 1979.
- RESENDE, R.R.; RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.M.; CASELA, C.R. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p.533-541, 2009.
- RITTER, H.; SCHULZ, G. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, v. 16, p.3426-3436, 2004.
- ROBERTS, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal Genetic Microbiology**, v. 134, p.169-176, 1988.
- RODRIGUES, F.A.; BENHAMOU, N.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; BÉLANGER, R.R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, p.535-546, 2003.

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

RODRIGUES, F.A.; JURICK, W.M.; DATNOFF L.E.; JONES J.B.; ROLLINS J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p.144-159, 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p.1051-1056, 1977.

SHETTY, R.; JENSEN, B.; SHETTY, N.P.; HANSEN, M.; HANSEN, C.W.; STARKEY, K.R.; JORGENSEN, H.J.L. Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. **Plant Pathology**, v. 61, p.120-131, 2011.

Sistema de análises estatísticas e genéticas - **SAEG**. (2007). Viçosa: UFV, (Versão 9.1)

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

VERMEIRE, M.L.; KABLAN, L.; DOREL, M.; DELVAUX, B.; RISÈDE, J.M.; LEGRÈVE, A. Protective role of silicon in the banana-*Cylindrocladium spathiphylli* pathosystem. **European Journal Plant Pathology**, v. 131, p.621-631, 2011.

XAVIER FILHA, M.S.; RODRIGUES, F.A.; DOMICIANO, G.P.; OLIVEIRA, H.V.; SILVEIRA, P.R.; MOREIRA, W.R. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. **Australasian Plant Pathology**, v. 40, p.28-38, 2011.

XU, JIN-R.; STAIGER, C.J.; HAMER, J.E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. **Plant Biology**, v.95, p.12713-12718, 1998.

ZIESLIN, N.; BEN-ZAKEN, R. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 31, p.333-339, 1993.

ZUCKER M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v.40, p.779-784, 1965.

Tabela 1. Período de incubação (PI), período latente (PL₆₀), área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) e concentração foliar de Si nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*.

Fatores				
Silício	PI (dias)	PL ₆₀ (dias)	AACPMR	Si (dag/kg)
-Si	11,02	17,75	93,16	0,40
+Si	12,82	20,54	63,22	0,56
Teste- <i>t</i>	0,74*	0,76*	23,47*	0,07*
Cultivares				
NuOpal	11,50	20,19	68,37	0,53
BRS Buriti	12,25	21,42	86,75	0,43
Teste- <i>t</i>	0,81 ^{ns}	1,43 ^{ns}	26,35 ^{ns}	0,23 ^{ns}
C.V. (%)	6,23	3,17	34,15	25,41

C.V. = coeficiente de variação; *, ^{ns} = não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste-*t*.

Tabela 2 - Número de lesões (NL) por cm² de área foliar e tamanho de lesões (TL) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*.

Cultivares	NL		TL	
	-Si	+Si	-Si	+Si
NuOpal	14,22 Aa	3,72 Bb	49,31 Aa	9,83 Bb
BRS Buriti	7,61Ba	4,84 Ab	31,42 Ba	12,97 Ab
C.V. (%)	8,43		3,89	

Médias na mesma coluna para cada componente de resistência, seguidas de letra maiúscula ou na mesma linha seguidas de letra minúscula diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação

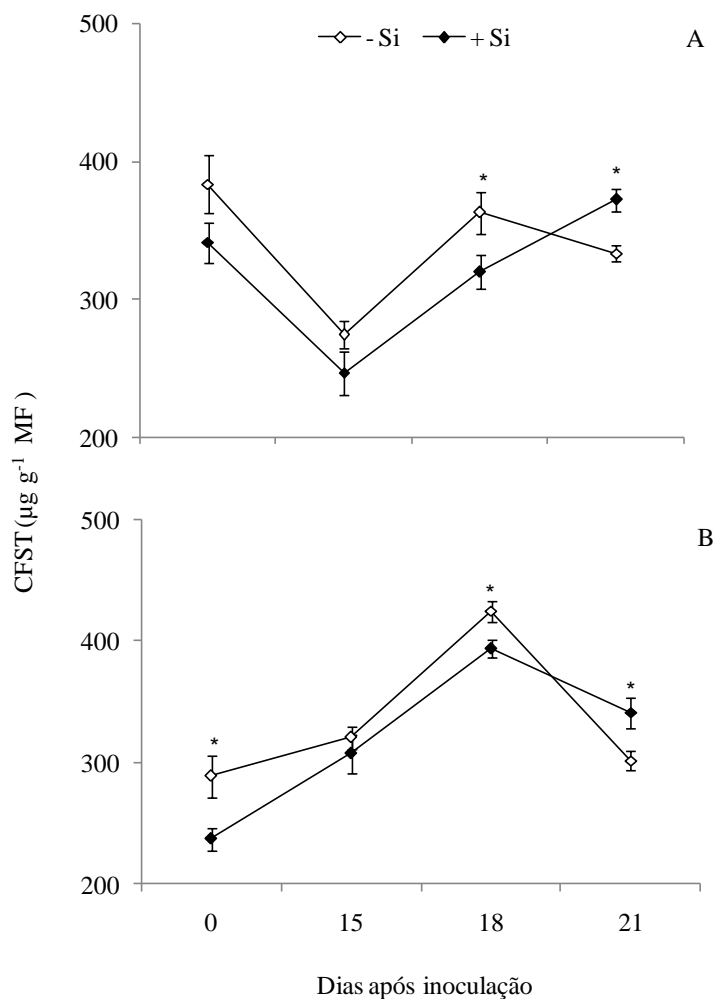


Figura 1 – Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$. MF = massa fresca.

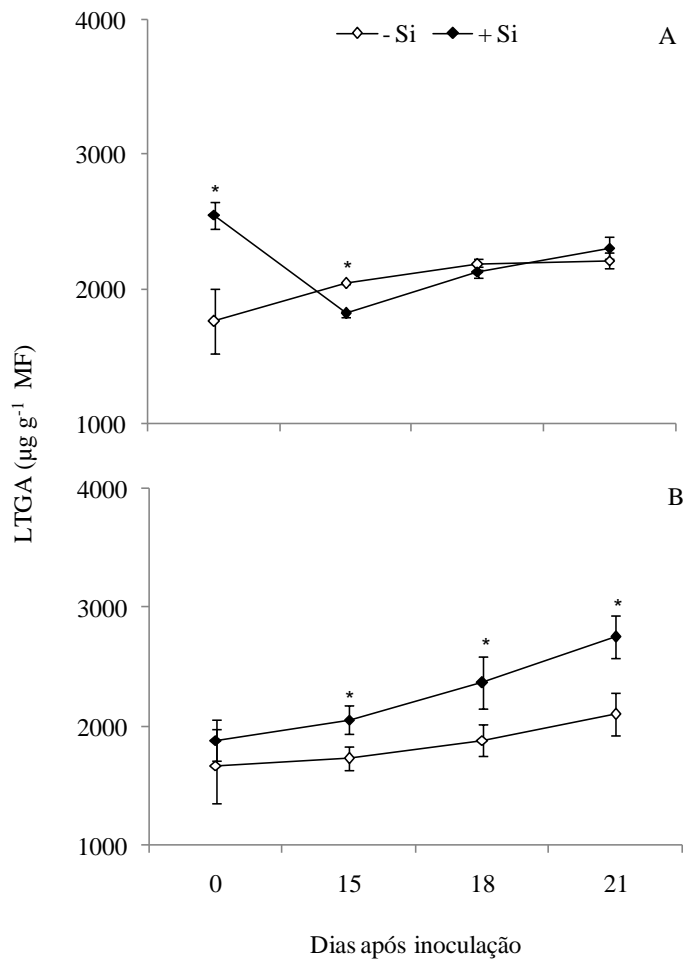


Figura 2 – Concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LTGA) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$. MF = massa fresca.

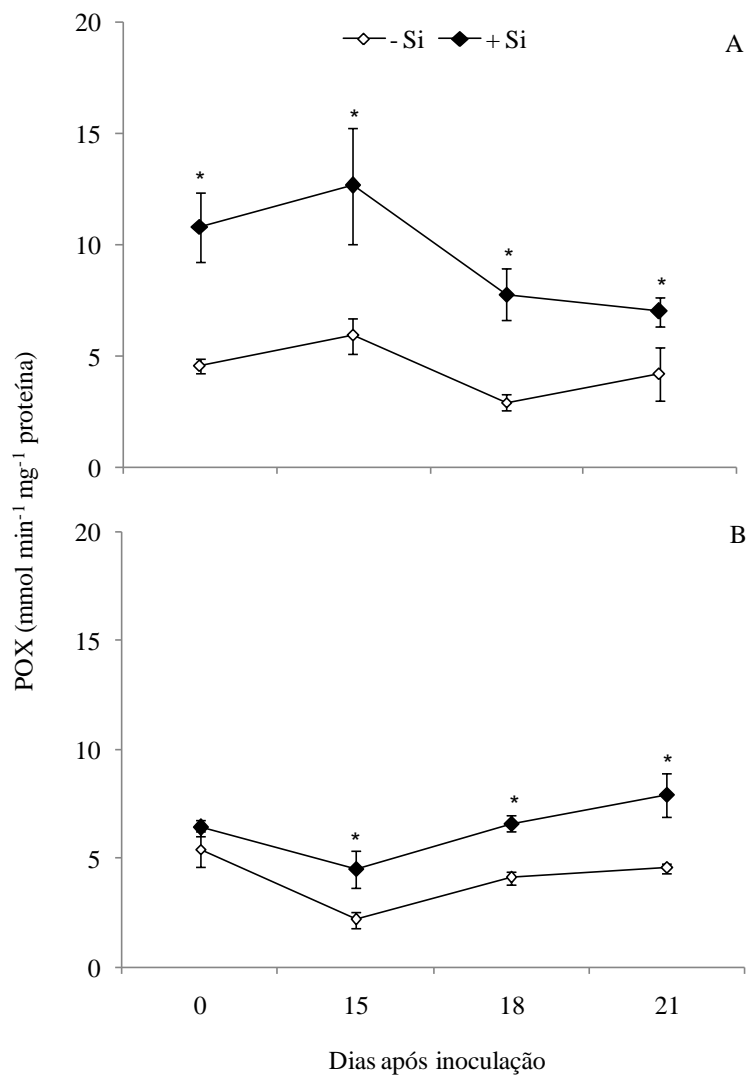


Figura 3 – Atividade de peroxidases (POX) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$.

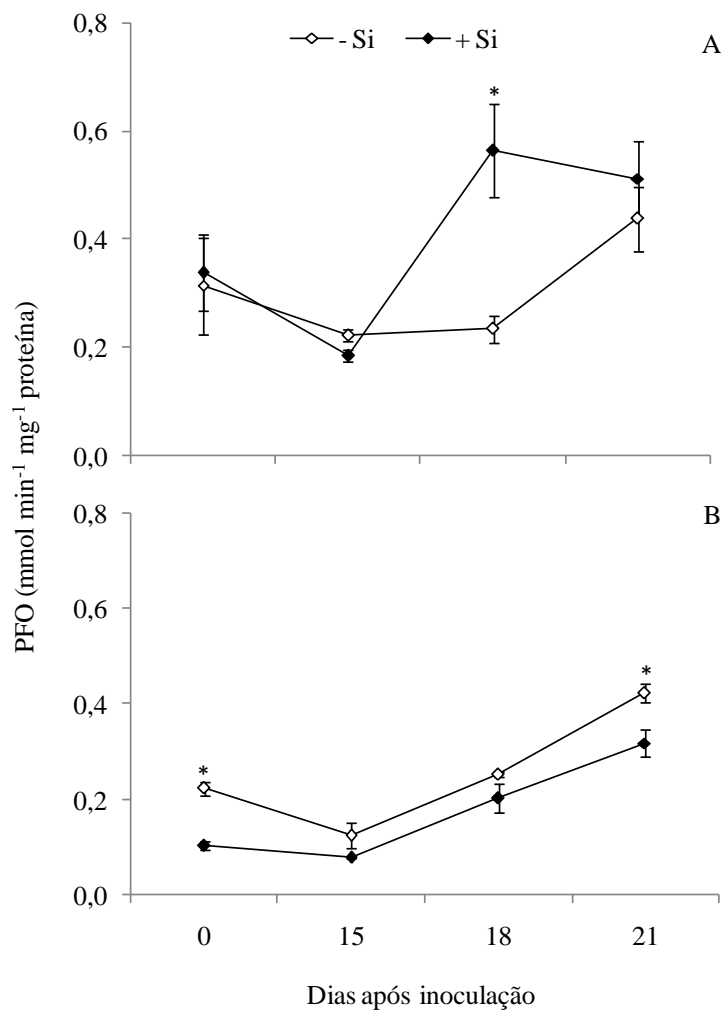


Figura 4 – Atividade de polifenoloxidasas (PFO) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$.

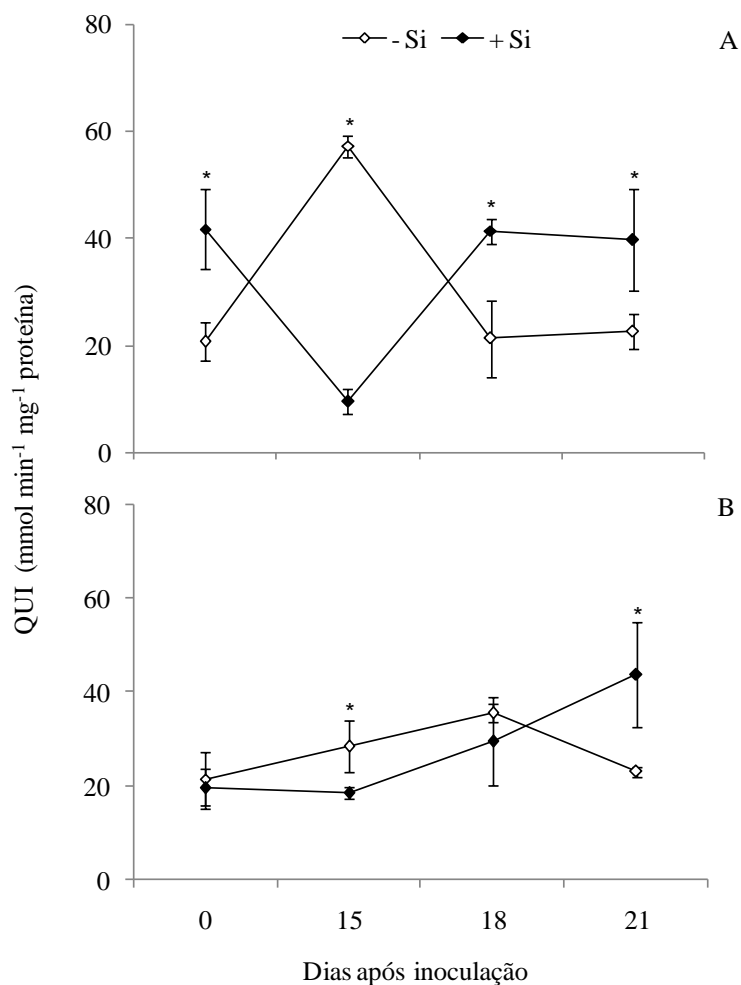


Figura 5 – Atividade de quitinases (QUI) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$.

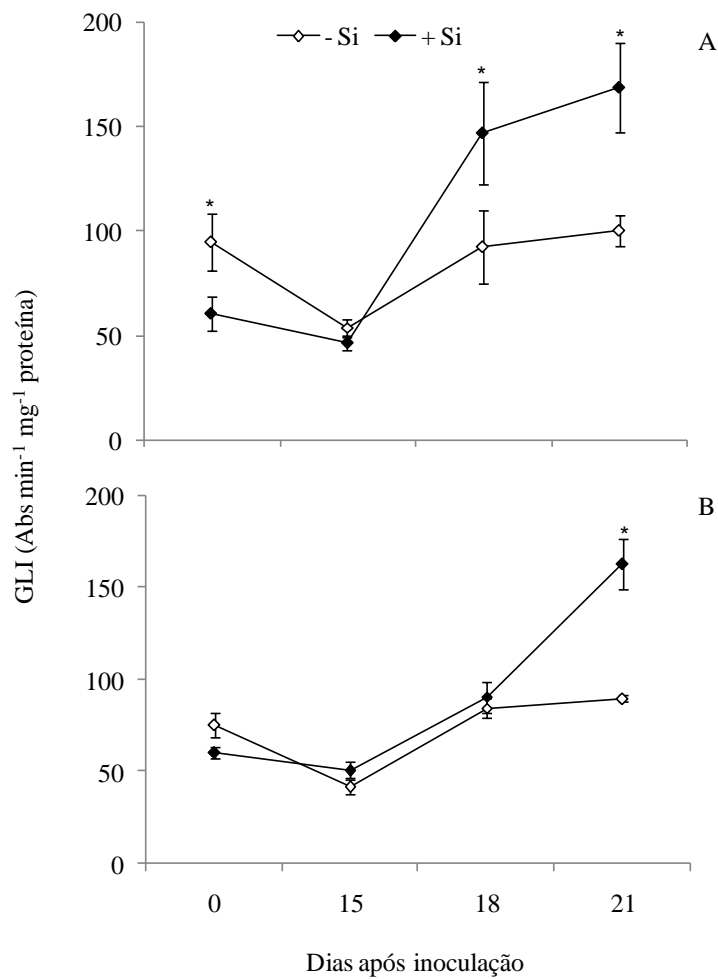


Figura 6 – Atividade de β -1,3-glicanases (GLI) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$.

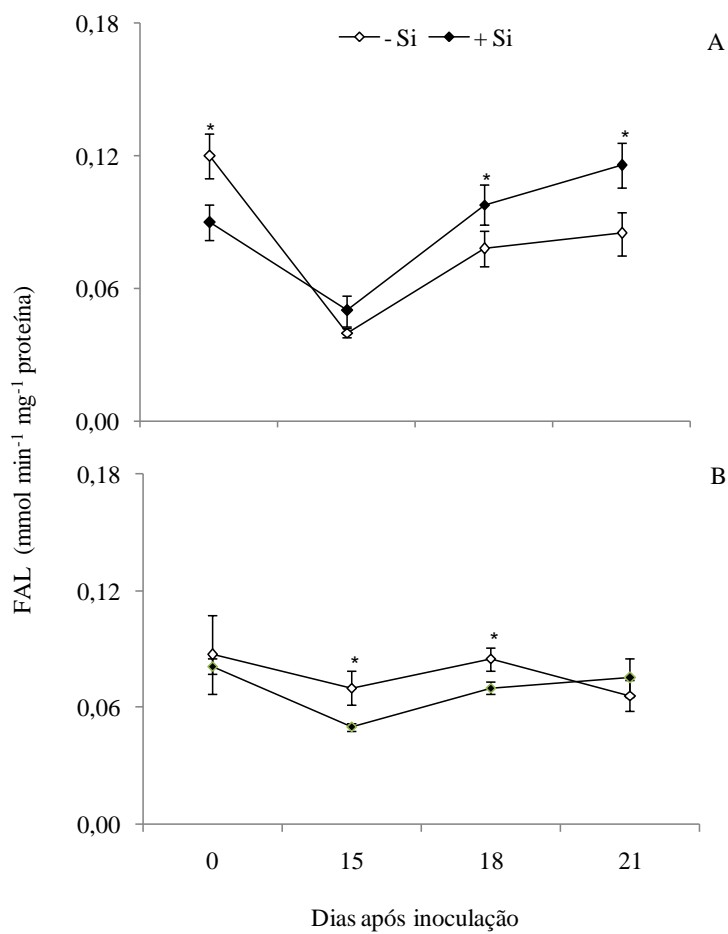


Figura 7 – Atividade de fenilalanina amônia-liases (FAL) nas folhas das plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$.

CAPÍTULO 2

Metabolismo Anti-Oxidativo em Plantas de Algodão Supridas com Silício e Infectadas por *Ramularia areola*

Resumo

As plantas reagem de diversas maneiras quando submetidas a condições adversas, sejam elas por estresse biótico ou abiótico. A utilização do Silício (Si) associado ao estresse biótico das plantas pode potencializar estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos. Mesmo nos casos em que isso não ocorra pode favorecer a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Desta forma, o presente estudo investigou o efeito do Si nas enzimas do metabolismo anti-oxidativo em plantas de algodão infectadas por *Ramularia areola*. Plantas de algodão das cultivares NuOpal (suscetível) e BRS Buriti (moderadamente resistente) foram cultivadas em solução nutritiva com ou sem a adição de Si. Avaliou-se a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e lipoxigenase (LOX). As concentrações de aldeído malônico (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR), extravasamento de eletrólitos (EE) e concentração foliar de Si também foram avaliados. A concentração foliar de Si aumentou em torno de 52% para as plantas supridas com esse elemento. Houve redução de 38% na AACPMR nas plantas supridas com Si. O fornecimento de Si as plantas de algodão das duas cultivares ocasionou aumento na atividade da SOD e APX, enquanto que reduziu a atividade da CAT. A atividade da GR foi maior nas plantas supridas com Si da cultivar BRS Buriti. Houve redução da concentração de H_2O_2 , MDA e EE para as duas cultivares. Houve aumentos significativos na atividade da LOX em plantas supridas com Si das duas cultivares até os 12 dias após inoculação (dai). Portanto, pode-se inferir neste estudo que o Si possa estar envolvido nas atividades metabólicas das plantas de algodão quando essas foram infectadas por *R. areola*, pois esse elemento aumentou a atividade das enzimas antioxidantes nas plantas de algodão que receberam sua suplementação. Diante do exposto, sugere-se que o Si pode aumentar a resistência do algodão ao estresse oxidativo induzido pela infecção por *R. areola*.

1. Introdução

A ocorrência de doenças é um dos principais problemas para as grandes perdas que ocorrem na produção do algodão em todas as regiões produtoras do país (Freire, 2011). A mancha de ramulária, causada por *R. areola* (Atk.), é a principal doença foliar da cultura do algodão (Suassuna & Coutinho, 2011). O fungo *R. areola* infecta as folhas provocando lesões angulares na superfície foliar, causando desfolha, o que prejudica o rendimento da cultura (Suassuna & Coutinho, 2011). A principal e a mais eficiente estratégia de manejo para reduzir os sintomas da mancha de ramulária é a aplicação de fungicidas (Andrade et al., 1999). Segundo Bolton (2009), os sintomas das doenças podem causar danos às membranas e ao funcionamento da maquinaria enzimática das plantas.

As plantas dispõem de diferentes estratégias de proteção contra os danos celulares e a possível morte causada pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) que induzem o chamado estresse oxidativo (Asada, 1999; Apel & Hirt, 2004). Em nível celular, a ERO ocasiona danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Asada, 1999), facilmente observados como sintomas de necrose e ou clorose em decorrência da degradação das clorofilas (Karpinski et al., 1999). Essas ERO são extremamente reativas com proteínas, material nucléico e, principalmente, com os lipídios presentes nas membranas, ocasionando a perda de seletividade, a peroxidação dos lipídeos na membrana plasmática (Fu & Huang, 2001) e a capacidade de compartimentalização celular (Asada, 1999). 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 et al., 2004), que também pode ser iniciada pelas lipoxigenases (LOX), a qual incorpora o oxigênio molecular em ácidos graxos poli-insaturados para formar hidroperóxidos lipídicos (Axelrod et al., 1981).

Dentre as principais enzimas antioxidantes envolvidas na detoxificação da ERO, podemos citar: as dismutases do superóxido (SOD) que catalizam a dismutação do O_2^- a H_2O_2 e constituem a primeira linha de defesa contra ERO (Alscher et al., 2002); as catalases (CAT) que convertem o H_2O_2 em água e oxigênio (Asada, 1999; Mittler, 2002) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa como as peroxidases do ascorbato (APX) que reduzem o H_2O_2 nos plastídeos utilizando o ascorbato como doador de elétrons (Yan et al., 1996). O ascorbato oxidado é, então, reduzido pela glutaciona

reduzida (GSH) oriunda da glutathiona oxidada (GSSG), catalizada pela redutase da glutathiona (GR) (Yan et al., 1996).

Embora o Si seja encontrado em quantidades excessivas na crosta terrestre, ficando atrás apenas do oxigênio, seu envolvimento na biologia das plantas e sua associação com as atividades metabólicas ainda é desconhecido (Epstein, 1999). Todavia, são inúmeros os benefícios que esse elemento fornece às plantas submetidas a condições de estresse (Datnoff et al., 2007). Diversos estudos relatam o envolvimento do Si nas plantas submetidas ao estresse abiótico com as ERO e o aumento na atividade de enzimas relacionadas com a defesa e ao metabolismo oxidativo das plantas como a peroxidase (POX) (Campos-Vargas & Saltveit, 2002), a SOD e a CAT (Svalheim & Robertsen, 1993).

Diversos trabalhos têm demonstrado que o silício (Si) está envolvido em vários aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos das plantas (Epstein, 1994). O fornecimento do Si promove aumento na atividade de enzimas antioxidantes, tais como a CAT, APX, a guaiacol peroxidase (GPX) e a SOD, além de variação nos níveis de peroxidação lipídica e interação com os mecanismos antioxidantes em folhas e raízes de plantas de algodão supridas com Si (Moldes et al, 2006). É relatado que o Si aumentou a atividade da SOD, POX, CAT e GR em folhas de plantas de cevada submetidas a estresse salino (Liang et al., 2003). As atividades da SOD, POX, CAT e SOD foram aumentadas nas folhas das plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *R. solani* (Zhang et al., 2006).

Assim, o presente trabalho tenta reforçar a hipótese de que o fornecimento de Si às plantas de algodão pode aumentar a atividade das enzimas antioxidantes tais como SOD, CAT, APX e GR, além de reduzir a severidade da mancha de ramulária e está envolvimento em outros mecanismos como o H_2O_2 , MDA, EE e a LOX. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do Si sobre o metabolismo antioxidativo em plantas de algodão infectadas por *R. areola*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão

A solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e foi constituída de: 6,0 mM KNO_3 ; 1,0 mM $NH_4H_2PO_4$; 2,0 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 4,0 mM $Ca_2(NO_3)_2$; 0,3 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1,3 μM

ZnSO₄.7H₂O; 46 µM H₃BO₃; 12,6 µM MnCl₂.4H₂O; 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 45 µM FeSO₄.7H₂O e 45 µM EDTA bisódico. O Si, fornecido como ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio através da resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, H⁺ forma, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2002). As concentrações de Si utilizadas foram de 0 e 2 mM. A adição do ácido monossilícico à solução nutritiva não alterou o pH.

Sementes de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% por 2 min e, posteriormente, lavadas 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. As plântulas foram mantidas em solução nutritiva com meia força iônica, contendo ou não ácido monossilícico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido a 5,5 e 6,0 empregando soluções de NaOH ou HCl (1 M) quando necessário. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Obtenção e preparo do inóculo de *R. areola* e inoculação das plantas de algodão

Folhas de plantas de algodão da cultivar Nu-Opal cultivadas no campo experimental Prof. Diogo Alves de Melo da UFV e apresentando sintomas da mancha de ramulária foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e trazidas para o Laboratório da Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitopatologia da UFV. O inóculo foi preparado lavando as folhas em água destilada contendo gelatina (1% p/v) com o auxílio de um pincel de cerdas macias para uma melhor remoção dos conídios. Posteriormente, a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze estéril para a retirada de possíveis impurezas e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios mL⁻¹ com o auxílio de um hemacitômetro.

Plantas de algodão no estágio V4 (30 dias após a emergência) (Marrur & Ruano, 2001) foram inoculadas com a suspensão de conídios de *R. areola* com o auxílio de um atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, EUA) de modo a cobrir homogeneamente as superfícies abaxial e adaxial das folhas. Posteriormente, as plantas

foram mantidas em câmara de nevoeiro (temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $\pm 90\%$) por 48 h e, em seguida, transferidas para câmaras de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de $50 \pm 5\%$ do Departamento de Fitopatologia da UFV. As plantas permaneceram nessas câmaras até o final do experimento.

2.3 Avaliação da severidade da mancha de ramulária

A severidade da mancha de ramulária foi avaliada aos 10, 12, 15, 18 e 21 dias após a inoculação (dai) utilizando-se uma escala diagramática proposta por Aquino et al., (2008). Os dados de severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) através da integração trapezoidal das curvas de progresso da doença de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

2.4 Determinações bioquímicas

Amostras da terceira, quarta e quinta folhas do ápice para a base das plantas de cada repetição foram coletadas aos 12, 15, 18, 21 dai, por volta das 8hs da manhã. Folhas coletadas de plantas não inoculadas (0 h) serviram como uma referência. As amostras foram coletadas individualmente em papel alumínio devidamente identificadas, as quais foram rapidamente congeladas e mantidas em nitrogênio (N₂) líquido durante a coleta e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer à -80 °C até análise.

2.5 Determinação das atividades 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 glutatona (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 0,3 g de massa fresca foliar em N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50

mM (pH 6,8) contendo 0,1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 2% de PVP. O homogeneizado foi centrifugado a $1.500 \times g$ por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como extrato para as determinações enzimáticas e para determinar a concentração de proteínas (Bradford, 1976).

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

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático em 2,97 mL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (Giannopolitis & Ries, 1977). As amostras controle tiveram absorbâncias medidas a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando-se mistura de reação mantida no escuro por 5 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT (Peixoto et al., 1999). A atividade da SOD foi expressa em Unidades (U) por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

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

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakman & Marschner (1993). A mistura de reação foi constituída de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) e 12,5 mM de H_2O_2 num volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 0,35 mL do extrato da enzima e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 durante 1 min a 240 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O coeficiente de extinção molar de $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

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

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano & Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H₂O₂ e 0,8 mM de ascorbato num volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 34 µL do extrato da enzima e a atividade foi determinada pela oxidação do H₂O₂ dependente do ascorbato durante 1 min a 290 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

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

Para obtenção do extrato da GR, 0,3 g de tecido foliar foram macerados com N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM, *DL*-ditioteitol 1 mM, PMSF 1 mM e PVP 2% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 × *g* por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi usado como extrato da enzima. A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático a 0,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, glutatona oxidada 1 mM e NADPH 0,1 mM preparado em tampão TRIS-HCl 0,5 mM (pH 7,5) segundo Carlberg & Mannervik (1985). O decréscimo na absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) na temperatura de 30 °C foi medido no primeiro minuto após o início da reação. A atividade da GR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM cm⁻¹ (Foyer & Halliwell, 1976). A atividade da GR foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976) e todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata.

2.6 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a obtenção do extrato usado na determinação da concentração de H₂O₂, 0,2 g de massa fresca foliar foram macerados com N₂ líquido em almofariz até 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 e o sobrenadante foi usado para determinar a concentração de H₂O₂ (Kuo & Kao, 2003). Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada a um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM em um volume final de 2 mL (Gay & Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorvância determinada a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva de calibração preparada com soluções de H₂O₂. Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ g⁻¹ de matéria fresca (Gay & Gebicki, 2000).

2.7 Determinação do aldeído malônico (MDA)

Foram macerados 0,2 g de massa fresca foliar em N₂ 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 de microcentrífuga 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 13.000 × g por 4 min. A absorvância 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 absorvância molar de 155 mM cm⁻¹ e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de material vegetal fresco (Cakmak & Host, 1991).

2.8 Determinação do extravasamento de eletrólitos (EE)

O extravasamento de eletrólitos foi determinado conforme metodologia descrita por Lima et al. (2002) com algumas modificações. Um total de 22 discos de 1 cm² foram obtidos de três folhas fisiologicamente mais expandidas de cada planta das repetições de cada tratamento foram lavados por duas vezes em água desionizada. Em seguida, os discos foram colocados em 60 mL de água desionizada a 25 °C. Após 4 h, foi realizada a primeira leitura da condutividade elétrica (CE1) em condutivímetro (Tecnoyon mCA-150, MS Tecnoyon 21 Instrumentação Científica, São Paulo). Em seguida, as amostras foram incubadas a 90 °C por 2 h, sendo, então, determinada a segunda leitura da condutividade elétrica (CE2). Esse procedimento foi realizado juntamente com cada coleta feita para as análises enzimáticas. O extravasamento de eletrólitos, em porcentagem foi obtido de acordo com fórmula: $EE (\%) = (CE1/CE2) \times 100$.

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

Para obtenção do extrato para determinação enzimática da LOX, 0,2 g de massa fresca foliar foi macerado com N₂ líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 0,1 mM EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 × g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado como extrato para determinação da atividade da LOX. A reação foi iniciada após adição de 0,3 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 0,3 µL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A mistura foi incubada em banho-maria por 4 min a 25 °C. A atividade da LOX sobre o ácido linoléico foi determinada conforme metodologia descrita por Axelrod et al. (1981). 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 resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. 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.

Todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata. A concentração de proteínas utilizada para o cálculo da atividade da LOX de cada amostra foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

2.10 Determinação da concentração foliar de Si

Após o término do experimento, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C durante 72h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 40 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica da digestão alcalina de 0,1 g de tecido seco (Korndörfer et al., 2004).

2.11 Delineamento experimental e análise estatística

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 pelos testes de Tukey ou test-*t* ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAEG 9.1 (Universidade Federal de Viçosa, 2007). A concentração foliar de Si foi correlacionada com AACPMR.

3. Resultados

3.1 Concentração foliar de Si e AACPMR

A concentração foliar de Si foi significativamente maior nas plantas supridas com esse elemento com aumentos de 52% em relação às plantas não supridas (Tabela 1) e aumentou em cerca de 47 % nas plantas das duas cultivares, quando comparadas com as

plantas não supridas com Si (Tabela 2). A AACPMR reduziu em 38% nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1).

3.2 Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo anti-oxidativo

A atividade da SOD nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si aumentou significativamente aos 0 e 15 dai (Fig. 1A) e nas plantas da cultivar BRS Buriti até os 15 dai em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 1B).

A atividade da CAT aumentou significativamente nas plantas das duas cultivares não supridas com Si dos 12 aos 21 dai em relação às plantas supridas com Si (Fig. 2A e B). Houve aumentos significativos na atividade da CAT nas plantas das duas cultivares supridas com Si apenas aos 0 dai em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 2A e B).

A atividade da APX nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si aumentou significativamente até os 18 dai, enquanto nas plantas da cultivar BRS Buriti este aumento se estendeu até os 21 dai em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 3A e B).

A atividade da GR nas plantas da cultivar NuOpal não supridas com Si aumentou significativamente aos 0 e 15 dai (Fig. 4A) e nas plantas da cultivar BRS Buriti apenas aos 15 dai em relação as plantas supridas com Si (Fig. 4B). Houve aumento significativo na atividade da GR nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si apenas aos 21 dai (Fig. 4A) e nas plantas da cultivar BRS Buriti aos 0, 12 e 21 em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 4B).

3.3 Concentração de H₂O₂

A concentração de H₂O₂ aumentou significativamente nas plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti supridas com Si aos 18 e 15 dai, respectivamente, em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 5A e B).

3.4 Concentração de MDA

As maiores concentrações de MDA ocorreram nas plantas das duas cultivares não supridas com Si até os 15 dai, em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 6A e B).

3.5 Extravasamento de eletrólitos (EE)

O EE aumentou significativamente nas plantas das cultivares NuOpal e BRS Buriti não supridas com Si dos 0 aos 21 dai e dos 15 aos 21 dai, respectivamente, em relação as plantas supridas com Si (Fig. 7A e B).

3.6 Atividade da LOX

A atividade da LOX aumentou significativamente nas plantas supridas com Si da cultivar NuOpal aos 0, 12 e 18 dai em relação as plantas não supridas com Si (Fig. 8A). Houve aumento significativo na atividade da LOX nas plantas da cultivar NuOpal não supridas com Si aos 15 dai em relação as plantas supridas com Si (Fig. 8A). A atividade da LOX aumentou significativamente nas plantas da cultivar BRS Buriti supridas com de Si apenas aos 12 dai em comparação as plantas não supridas com Si (Fig. 8B). Houve aumentos significativos na atividade da LOX nas plantas da cultivar BRS Buriti não supridas com Si aos 15 e 21 dai em relação às plantas supridas com Si (Fig. 8B).

4. Discussão

O presente estudo apresenta as primeiras informações sobre as enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo das plantas de algodão inoculadas por *R. areola* e potencializadas pelo Si. O fornecimento desse elemento contribuiu para aumentar a atividade das enzimas SOD, APX e GR no patossistema algodão - *R. areola*, impactando negativamente o progresso da mancha de ramulária, comprovado pela redução da AACPMR, indicando possível envolvimento do Si na potencialização da resistência a *R. areola* em plantas de algodão. Estes resultados se assemelham a outros estudos que demonstraram os efeitos benéficos do Si em reduzir a intensidade de doenças em culturas economicamente importantes (Datnoff et al., 2007; Rodrigues et al., 2009).

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) é geralmente incrementada para promover melhor eliminação das ERO e uma maior proteção celular contra danos oxidativos (Asada, 1999; Mittler, 2002; Blokhina et al., 2003; Reddy et al., 2004; Jaleel et al., 2009). Para evitar danos oxidativos, atividade da APX não deve ser

apenas alta, mas suficientemente equilibrada, de forma que possa eliminar o H_2O_2 gerado pela ação da SOD (Asada et al., 1999). No presente estudo, a maior atividade da SOD que, potencialmente acarreta maior produção de H_2O_2 , foi acompanhada de incrementos nas atividades da APX e GR, ainda que a atividade da CAT não tenha sido alterada pelo Si. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um papel de destaque das enzimas APX e GR, na medida em que se observaram reduções significativas na concentração de H_2O_2 . Isso explicaria, pelo menos em parte, as reduções no extravassamento de eletrólitos e menor peroxidação lipídica. De qualquer modo, como a atividade da SOD e APX foram maiores nas plantas de algodão supridas com Si da cultivar BRS Buriti, pode-se inferir que esta cultivar, por ser considerada moderadamente resistente, apresenta outros mecanismos de defesa que contribuíram para a redução de H_2O_2 , MDA e EE. Assim, a detoxificação de O_2 nessas plantas pode ser parcialmente resultante da atividade da SOD nos cloroplastos (Mittler, 2002), como também O_2 com o ascorbato ou com a glutatona reduzida (Mittler, 2002; Jaleel et al., 2009). Zhu et al. (2004), relataram aumento na atividade da SOD, APX, GR com exceção da CAT em plantas de pepino supridas com Si e mantidas sob estresse salino. Os resultados obtidos neste estudo para o H_2O_2 reforçam a hipótese de que o Si pode potencializar o aumento das atividades das enzimas no metabolismo antioxidativo de plantas sob condições de estresse. Resultados semelhantes foram obtidos por Al-Aghabary et al. (2004), que demonstraram, em plantas supridas com Si, redução na produção de H_2O_2 induzida pela salinidade.

Altas concentrações de MDA produzidos durante a peroxidação de lipídeos é um forte indicador dos danos celulares causados nas membranas, o que resulta em aumento na magnitude do EE (Liang et al., 2003). A menor AACPMR nas plantas supridas com Si indica, indiretamente, uma menor colonização do fungo nos tecidos foliares o que é associada com a menor concentração de H_2O_2 , de MDA e de EE. No presente estudo, as concentrações foliares de MDA evidenciaram claramente que as plantas de algodão sofreram danos oxidativos nos lipídios da membrana, com efeitos na sua permeabilidade, principalmente nas plantas não supridas com Si. Efeitos benéficos do Si atuando na integridade da membrana plasmática já foram relatados em plantas de tomate e pepino sob condições de estresse salino (Al-Aghabary et al., 2004; Zhu et al., 2004). Porém, a magnitude dos danos oxidativos difere entre espécies ou genótipos e em resposta à intensidade e duração do estresse (Sgherri et al., 2000).

Liang et al. (1996, 2003) demonstraram que a concentração de MDA e EE foram menores nas plantas de cevada supridas com Si sob condições de estresse. Esses estudos se assemelham com os dados obtidos no presente estudo, em que as plantas de algodão das duas cultivares supridas com Si apresentaram menores concentrações foliares de MDA e EE. Além disso, Liang et al. (2006) mostraram que, com o fornecimento de Si às plantas de cevada, a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática foi maior e conseqüentemente, a estabilidade dos lipídios nelas contidos foi maior.

O aumento da atividade da LOX foi constatado nas plantas supridas com Si até os 12 dias nas duas cultivares, indicando sua participação na resposta da planta de algodão ao ataque do patógeno. As LOX são enzimas que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados, produzindo hidroperóxidos de ácidos graxos, e estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido jasmônico e aldeídos (Bunker et al., 1995); no crescimento e desenvolvimento das plantas (Siedow, 1991); na resposta à ferimentos (Vieira et al., 2001); e resistência à patógenos (Croft et al., 1993). Os resultados desse estudo podem ter alguma relação com as observações feitas por Vaughn & Gardner (1993), que relataram que os aldeídos e oxiácidos podem causar efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos. Além disso, tem sido relatado que a magnitude da atividade de LOX no tecido vegetal pode variar como resposta fisiológica da planta a diferentes tipos de estresses (Silva et al., 2001). Esses autores ainda observaram que a LOX aumentou em plantas de soja infectadas por *Diaphorthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*.

No presente estudo, os resultados sugerem que o Si afetou a fisiologia das plantas de algodão infectadas por *R. areola*, auxiliando na manutenção da integridade da membrana plasmática. Além disso, o sistema enzimático nas plantas supridas com Si (especificamente as enzimas SOD, APX e GR) sugere que, talvez, essas enzimas estejam envolvidas na potencialização da resistência do algodão à mancha de ramulária mediada pelo Si.

5. Referências

AL-AGHABARY, K.; ZHU, Z.; SHI, Q. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. **Journal Plant Nutrition**, v. 12, p.2101-2115, 2004.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, I.S. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants. **Journal Experimental Botanic**, v. 53, p.1331-1341, 2002.

ANDRADE, P.M.C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Controle químico de doenças em algodão no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p.262-265, 1999.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p.373-399, 2004.

AQUINO, L.A.; BERGER, P.G.; RODRIGUES, F.A.; ZAMBOLIM, L.; HERNANDEZ, J.F.R.; MIRANDA, L.M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramulária do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p.361-363, 2008.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p.601-639, 1999.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenases from soybeans. In: LOWENSTEIN, J.M. (Ed), **Methods in Enzymology**, New York: Academic Press. p. 441-451, 1981.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p.179-194, 2003.

BOLTON, M.D. Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p.487-97, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BUNKER, T.W.; KOETJE, D.S.; STEPHENSON, L.C.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, v. 7, p.1319-1331, 1995.

CAKMAK, I.; STRBOE, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxides scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal Experimental Botany**, v. 44, p.127-132, 1993.

CAMPOS-VARGAS, R.; SALTVEIT, M.E. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. **Physiologia Plantarum**, v. 114, p.73-84, 2002.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 13, p.484-490, 1985.

CROFT, K.P.C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, v. 101, p.13-24, 1993.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: **Mineral Nutrition and Plant Disease**. The American Phytopathological Society. p. 233-246, 2007.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 91, p.11-17, 1994.

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

FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v.133, p.21-25, 1976.

FREIRE, E. C. História do algodão no Cerrado. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília, p. 23-61, 2011.

FU, J.; HUANG, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 45, p.105-114, 2001.

GAY, C.; GEBICKI, J.M.A. Critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, p.217-220, 2000.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p.309-314, 1977.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Cir. 32. 1950.

JALEEL, C.A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H.J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 31, p.427-436, 2009.

KARPINSKI, S.; REYNOLDS, H.; KARPINSKA, B.; WINGSLE, G.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. The role of hydrogenperoxide and antioxidants in systemic acclimation to photo-oxidative stress in *Arabidopsis*. In: SMALLWOOD, M. F., CALVERT, C. M., BOWLES, D. J. (Eds.), **Plant Responses to Environmental Stress**, BIOS Scientific Publishers, Oxford, p. 25-32, 1999.

Korndörfer, G.H.; Pereira, H.S.; Nolla, A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia, MG, Brasil. Boletim Técnico. Universidade Federal de Uberlândia, 2004. 24 p.

KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p.149-152, 2003.

LIANG, Y.C.; CHEN, Q.; LIU, Q.; ZHANG, W.H.; DING, R.X. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1157-1164, 2003.

LIANG, Y.C.; ZHANG, W.H.; CHEN, Q.; LIU, Y.L.; DING, R.X. 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**, v. 57, p.212-219, 2006.

LIMA, A.L.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p.239-247, 2002.

LINAG, Y.C.; SHEN, Q.R.; SHEN, Z.G.; MA, T.S. Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. **Journal of Plant Nutrition**. v.19, p.173-183, 1996.

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

MARRUR, C.J.; RUANO, O. A reference system of determination of cotton plant development. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 5, p.313-317, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p.405-410, 2002.

MITTLER R.; VANDERAUWERA S.; GOLLERY M.; VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v. 9, p.490-498, 2004.

MOLDES, C.A.; BATISTA, G.B.; FONTÃO-FILHO, O.; AZEVEDO, R.A.; TSAI, S.M. Actividad de enzimas antioxidantes em algodón com diferentes dosis de silício. In:

Reunião de La Asociación Argentina de Fisiología Vegetal, 26, Chascomus, Argentina. 2006.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate- specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p.867-880, 1981.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANTANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.11, p.137-143, 1999.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p.1189-1202, 2004.

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

SGHERRI, C.L.M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p.273-279, 2000.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1056, 1977.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.145-188, 1991.

SILVA, M.D.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, A.C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *diaphorte phaseolorum* f.sp. *Meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.316-328, 2001.

Sistema de análises estatísticas e genéticas - **SAEG**. (2007). Viçosa: UFV, (Versão 9.1)

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodão no cerrado brasileiro. In: Freire, E.C (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília, p. 479-521, 2011.

SVALHEIM, O.; ROBERTSEN, B. 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**, v. 88, p.675-681, 1993.

- VAUGHN, S.F.; GARDNER, H.W. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.2337-2345, 1993.
- VIEIRA, A.A. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.5-12, 2001.
- YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S.; WANG, Z. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, v. 179, p.261-268, 1996.
- ZHANG, G.L.; DAI, Q.G.; ZHANG, H.C. Silicon application enhances resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*) in rice. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, p.600-606, 2006.
- ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v.167, p.527-533, 2004.

Tabela 1. Concentração foliar de silício (Si) e a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) em plantas de algodão cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) e inoculadas com *Ramularia areola*.

Tratamentos	Si (dag/kg)	AACPMR
-Si	0,38	94,30
+Si	0,79	61,46
teste- <i>t</i>	0,06*	22,95*
C.V. (%)	27,78	36,47

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

C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 2. Concentração foliar de silício (Si) em plantas de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) e inoculadas com *Ramularia areola*.

Tratamentos	Cultivares	
	NuOpal	BRS Buriti
-Si	0,48	0,30
+Si	0,88	0,58
teste- <i>t</i>	0,06*	0,05*
C.V. (%)	15,38	12,26

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

C.V. = coeficiente de variação.

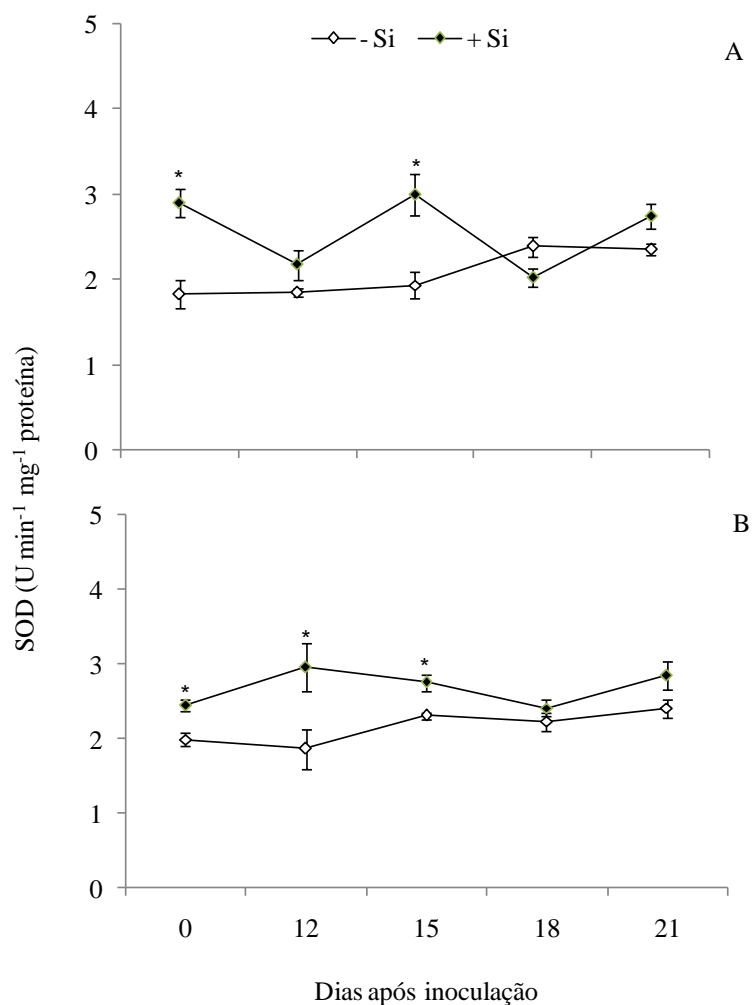


Figura 1. Atividade da superóxido dismutases (SOD) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

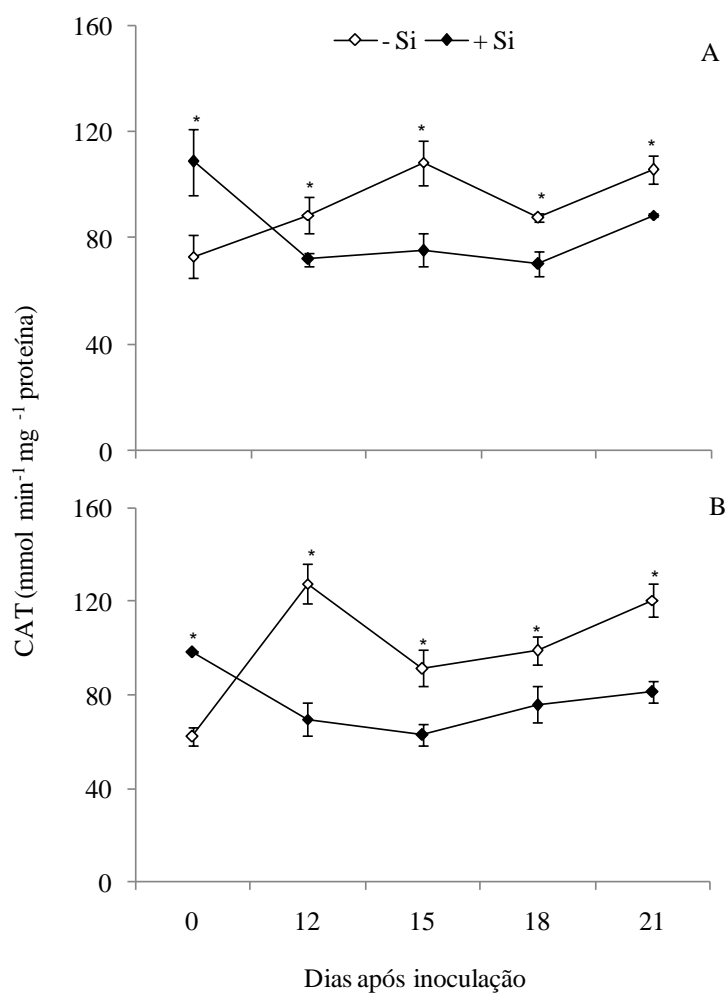


Figura 2. Atividade de catalases (CAT) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

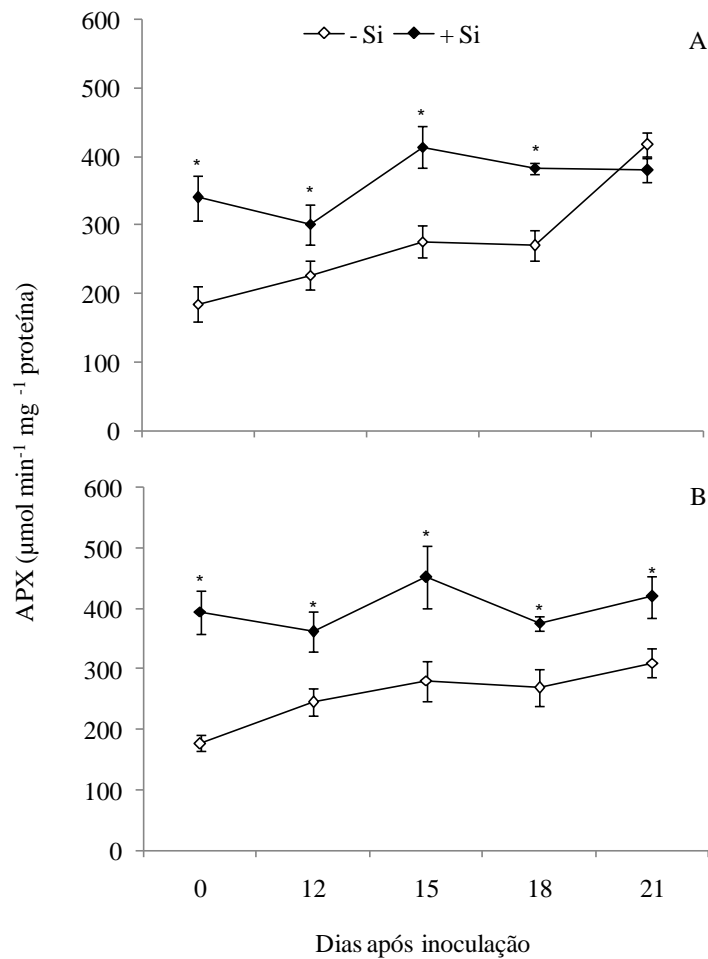


Figura 3. Atividade da ascorbato peroxidases (APX) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

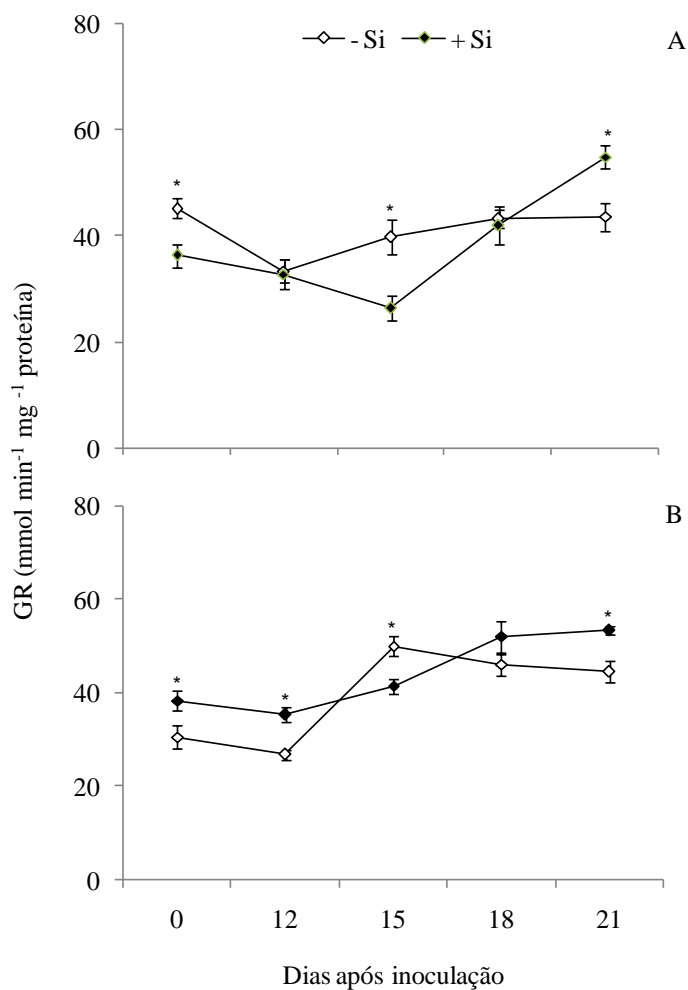


Figura 4. Atividade da glutathione redutase (GR) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

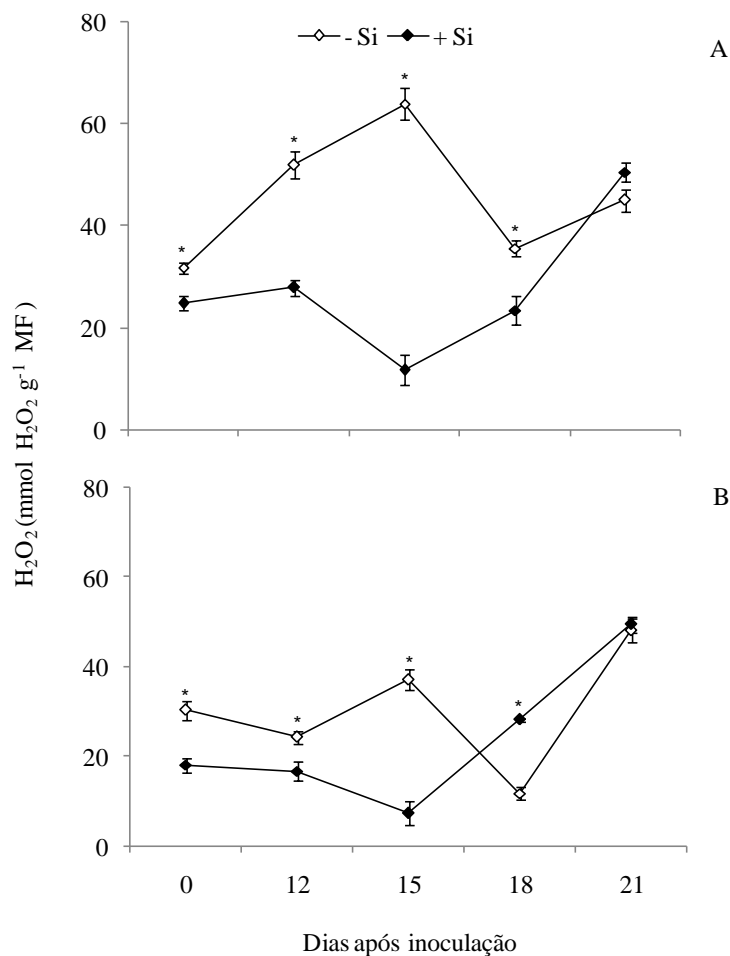


Figura 5. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$. MF = massa fresca.

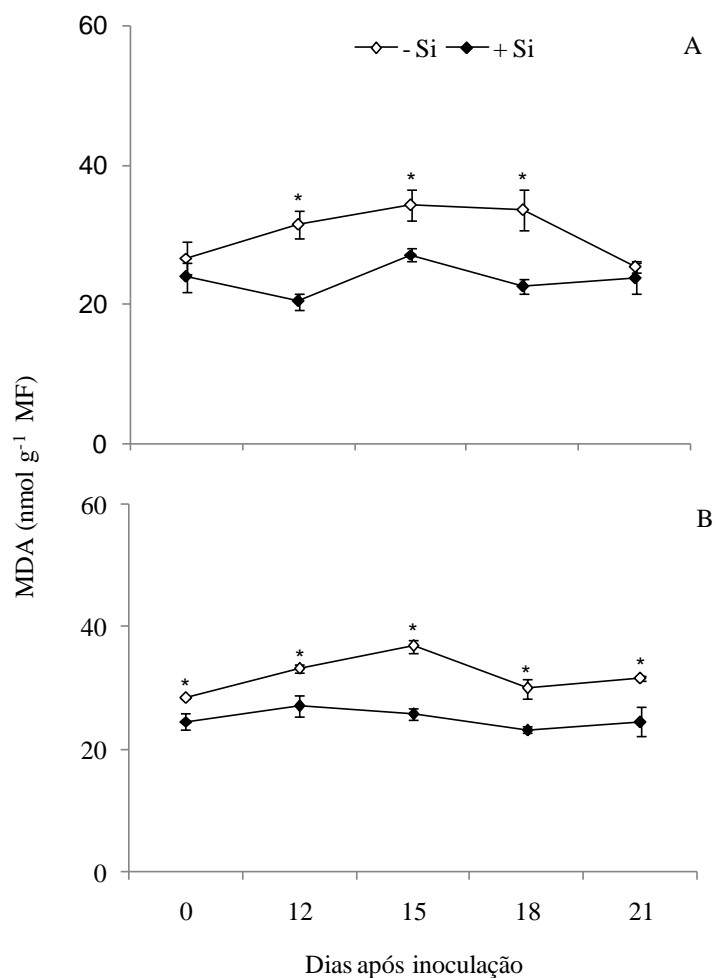


Figura 6. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$. MF = massa fresca.

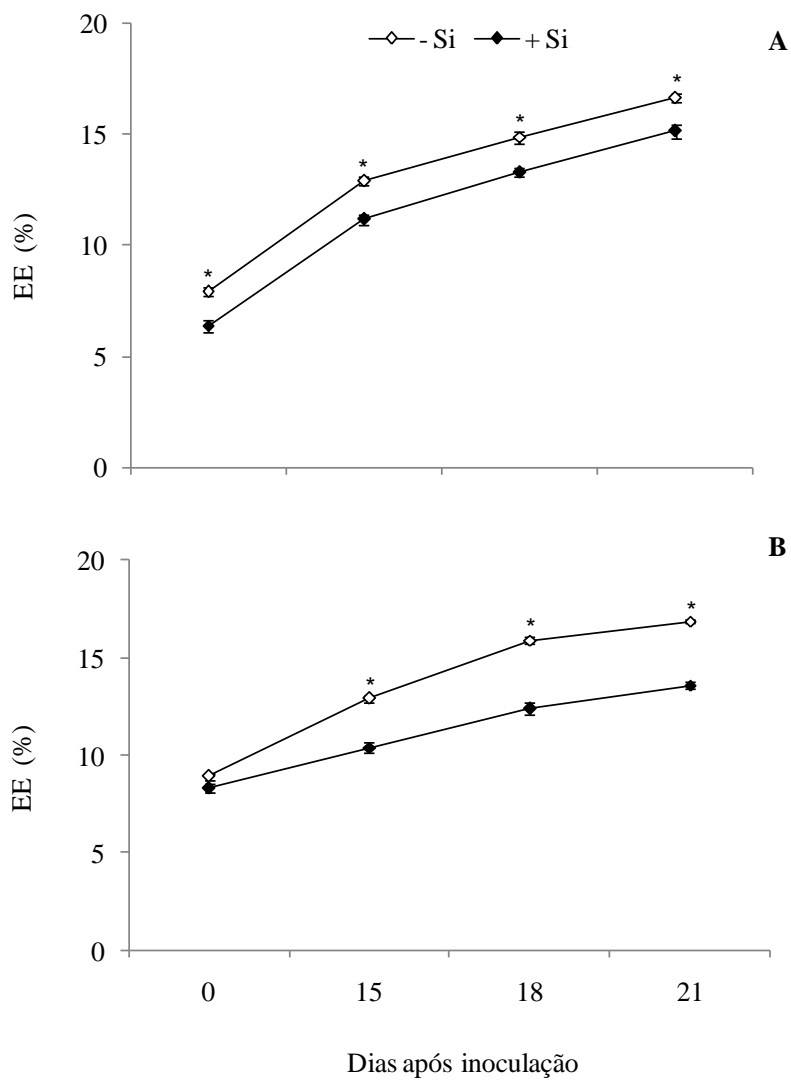


Figura 7. Extravassamento de eletrólitos (EE) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

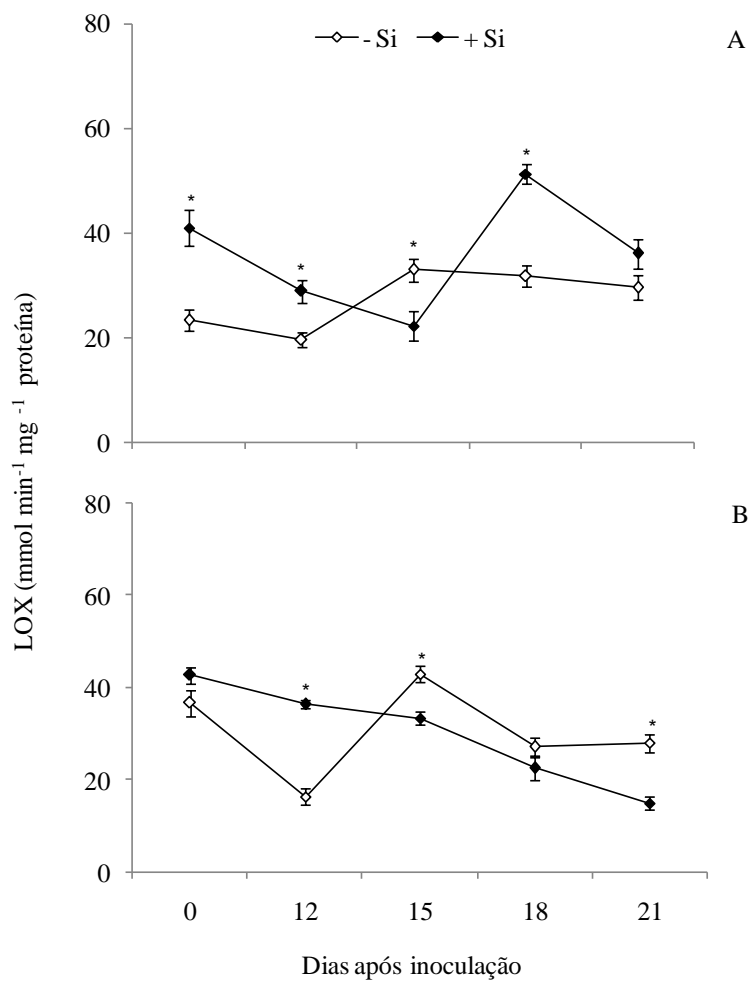


Figura 8. Atividade de lipoxigenases (LOX) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A) e BRS Buriti (B) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 4$

CAPÍTULO 3

Alterações no Metabolismo Fotossintético de Plantas de Algodão Supridas com Silício e Infectadas por *Ramularia areola*

Resumo

Tem sido atribuído ao Silício (Si) o benefício da redução da severidade de importantes doenças fúngicas, além de ter influência positiva sobre a capacidade fotossintética das plantas de diversas culturas economicamente importantes. Objetivou-se com este estudo investigar o efeito do Si sobre a capacidade fotossintética de plantas de algodão das cultivares NuOpal (suscetível) e BRS Buriti (moderadamente resistente) infectadas por *Ramularia areola* e supridas ou não com Si. Avaliaram-se os parâmetros de trocas gasosas: taxa líquida de fixação do CO₂ (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a), a eficiência intrínseca da fotossíntese (A/C_i) e a concentração de pigmentos. A concentração foliar de Si foi aumentada e houve decréscimo na área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) em plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. A infecção por *R. areola* em plantas de algodão afetou todos os parâmetros de trocas gasosas nas plantas das duas cultivares. Houve redução da A , da g_s , da E e na eficiência intrínseca da fotossíntese. O fornecimento de Si às plantas de algodão das duas cultivares aumentou a A em paralelo a aumentos em g_s . O fornecimento de Si aumentou as concentrações de clorofila a (cl_a), clorofila b (cl_b) e carotenóides nas plantas das duas cultivares em pontos isolados nos estádios avançados da infecção. Os resultados deste estudo sugerem que o Si pode interagir com muitos componentes do sistema fisiológico do algodão, potencializando sua resistência ao patógeno.

1. Introdução

A cultura do algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch), além da significativa importância socioeconômica para o sistema agroindustrial do Brasil e do mundo, tem adquirido considerável destaque pela sua suscetibilidade a diversas doenças causadas por microrganismos (Suassuna & Coutinho, 2011). Dentre as doenças que afetam a cultura do algodão, a mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* (Atk.), destaca-se por causar perdas consideráveis ao algodão (Aquino et al., 2008). Esse fungo causa lesões angulosas de aspecto farináceo entre as nervuras, podendo ocorrer em todo o limbo foliar em estádios mais avançados de incidência (Suassuna & Coutinho, 2011). O controle dessa doença é feito unicamente mediante uso de fungicidas (Andrade et al., 1999).

Sabe-se que os danos causados pelos patógenos às plantas são inúmeros, mas o prejuízo especificamente na sua fisiologia merece destaque por causar alterações sobre os processos fotossintéticos (Berger et al., 2007). Diversos trabalhos têm relatado que as infecções por patógenos têm levado a modificações no aparato fotossintético, principalmente no decréscimo na taxa de fotossíntese e condutância estomática. Pode haver redução da taxa fotossintética proveniente da redução da condutância estomática ou retroinibição metabólica da fotossíntese ou ainda ocasionado por um dano direto no aparato fotossintético (Bastiaans, 1993; Lichtenthaler & Miehe, 1997; Chou et al., 2000; Berger et al., 2007). Alguns parâmetros fotossintéticos relacionados com as trocas gasosas e a concentração de pigmentos têm extrema importância por serem considerados indicadores essenciais do comportamento da atividade fotossintética em plantas sob condições de estresse, incluindo o causado pela infecção por patógenos (Berger et al., 2007).

Tem sido relatado em inúmeros trabalhos que o fornecimento de Si às plantas é capaz de reduzir a intensidade de várias doenças (Datnoff et al., 2007) e essa redução pode ser explicada pela silicificação das células epidérmicas, o que atrasaria a penetração do patógeno nas células foliares (Seebold et al., 2001). Entretanto, ainda não é totalmente entendido o envolvimento do Si na biologia e fisiologia das plantas superiores, mesmo trazendo inúmeros benefícios a várias espécies de plantas, especialmente sob condições de estresses bióticos (Ma, 2004) ou abióticos (Ma & Yamaji, 2006).

Não existe nenhuma informação na literatura sobre o efeito do Si nos processos fotossintéticos na interação algodão - *R. areola*. Dessa forma, este estudo tenta demonstrar o efeito benéfico do Si sob a maquinaria fotossintética reforçando a hipótese de que esse elemento esteja envolvido nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque dos patógenos, minimizando os prejuízos causados por esses no aparato fotossintético. Assim, objetivou-se, com este estudo, investigar o efeito do Si nas trocas gasosas e na concentração de pigmentos em plantas de algodão infectadas por *R. areola*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodão: a solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e foi constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca₂(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 e 45 µM EDTA bisódico. O Si, fornecido como ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio através da resina de troca de cátions (Amberlite IR-120B, H⁺ forma, Sigma-Aldrich, São Paulo) (Ma et al., 2002). As concentrações de Si utilizadas foram de 0 e 2 mM. A adição do ácido monossilícico à solução nutritiva não alterou o seu pH.

Sementes de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% por dois minutos e, posteriormente, lavadas em água destilada por três minutos 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. As plântulas foram mantidas em solução nutritiva com meia força iônica, contendo ou não ácido monossilícico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total. A solução nutritiva foi aerada, trocada a cada quatro dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 85% do valor inicial. O pH da solução nutritiva foi verificado diariamente e mantido a 5,5 e 6,0 empregando soluções de NaOH ou HCl (1 M) quando necessário. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Obtenção e preparo do inóculo de *R. areola* e inoculação das plantas de algodão: folhas de plantas de algodão da cultivar NuOpal cultivadas no campo experimental Prof. Diogo Alves de Melo da UFV e apresentando sintomas da mancha de ramulária foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e trazidas para o Laboratório da Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitopatologia da UFV. O inóculo foi preparado lavando as folhas em água destilada contendo gelatina (1% p/v) com o auxílio de um pincel de cerdas macias para uma melhor remoção dos conídios. Posteriormente, a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze estéril para a retirada de possíveis impurezas e ajustada para a concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios/mL com o auxílio de um hemacitômetro.

Plantas de algodão no estágio V4 (30 dias após a emergência) (Marur & Ruano, 2001) foram inoculadas com a suspensão de conídios de *R. areola* com o auxílio de um atomizador (VLS-Set Airbrush, Paache Airbrush Company, USA) cobrindo homogeneamente as superfícies abaxial e adaxial das folhas. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $\pm 90\%$) por 48 h e, em seguida, transferidas para câmaras de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de $50 \pm 5\%$ pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da UFV. As plantas permaneceram nessas câmaras até o final do experimento.

2.3 Avaliação da severidade da mancha de ramulária: a severidade da mancha de ramulária nas plantas de algodão foi avaliada a partir do 10º dia após inoculação (dai) utilizando-se uma escala diagramática proposta por Aquino et al. (2008). Os dados da severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) através da integração trapezoidal das curvas de progresso da doença de acordo com a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

2.4 Determinação das trocas gasosas: as trocas gasosas foram determinadas utilizando-se um sistema portátil de medição de trocas gasosas (LC pro+, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). A taxa líquida de fixação do CO₂ (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 intrínseca da fotossíntese (A/C_i) foram determinadas na quarta folha do ápice para a base nas plantas (estádio V5; Marur & Ruano, 2001). As avaliações foram realizadas no período das 7:30 às 11:30 h, em

sistema aberto sob irradiância de saturação de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração atmosférica de CO_2 (C_a) de $\approx 390 \mu\text{mol mol}^{-1}$. A umidade relativa do ar foi de $\approx 80 \pm 5\%$ e a temperatura foliar variou de 27 a 33 °C. Para estimular a atividade plena da maquinaria fotossintética, as plantas foram mantidas por 30 min fora da câmara de nebulização, sob pleno sol, antes das avaliações. As medições foram realizadas aos 12, 15, 18 e 21 dai. As avaliações também foram realizadas nas plantas não inoculadas com *R. areola* (0 h).

2.5 Determinação da concentração de pigmentos: amostras de 100 mg da quarta folha das plantas foram coletados aos 0, 12, 15, 18 e 21 dai. As amostras foram trituradas em nitrogênio (N_2) líquido contendo 0,1 g de carbonato de cálcio e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL de acetona 80% (v/v) por 1 minuto sob luz verde. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman # 1. O resíduo foi lavado por 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 Determinação da concentração foliar de Si: após o término do experimento, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água destilada e secadas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C durante 72h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 40 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica da digestão alcalina de 0,1 g de tecido seco (Korndörfer et al., 2004).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística: foram conduzidos dois experimentos sendo o primeiro (Exp. 1) para avaliar a severidade da mancha de ramulária, as trocas gasosas e a concentração foliar de Si e o segundo (Exp. 2) para obter amostras para as determinações das concentrações de pigmentos. O Exp 1 foi instalado em delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, constituído de duas cultivares, duas doses de Si e duas formas de inoculação e com dez repetições. O Exp. 2 foi instalado em delineamento experimental inteiramente

casualizado num esquema fatorial 2×2 com quatro repetições. Os fatores estudados foram: duas cultivares de algodão e duas doses de Si. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas de algodão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de Tukey ou test-*t* ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAEG 9.1 (Universidade Federal de Viçosa, 2007). A AACPMR foi correlacionada com os parâmetros fotossintéticos e esses também foram correlacionados entre si.

3. Resultados

3.1 AACPMR e concentração foliar de Si

Houve interação significativa entre os fatores cultivares \times doses de Si para a AACPMR e para a concentração foliar de Si (Tabela 1). A concentração foliar de Si aumentou em 67% e foi acompanhada de redução de 36% na AACPMR nas plantas das duas cultivares supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 1).

3.2 Trocas gasosas

Houve efeito significativo do fator blocos para todas as variáveis de trocas gasosas (Tabela 2). Houve efeito significativo do fator cultivares para as variáveis A , g_s e E (Tabela 2). Houve efeito significativo do fator inoculação e do fator doses de Si para as variáveis A , g_s , E e A/C_i (Tabela 2). A interação entre os fatores cultivares \times inoculação foi significativa para as variáveis A e g_s (Tabela 2); a interação entre os fatores cultivares \times doses de Si foi significativa para as variáveis A , g_s e E (Tabela 2); a interação entre os fatores inoculação \times doses de Si foi significativa para as variáveis A , g_s e E (Tabela 2); e a interação entre os fatores cultivares \times inoculação \times doses de Si foi significativa para as variáveis A , g_s e E (Tabela 2).

A A e g_s aumentou significativamente nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si e não-inoculadas com *R. areola* aos 12, 15, 18 e 21 dai (Fig. 1A e 2A) e nas plantas da cultivar BRS Buriti aos 15, 18 e 21 dai, quando comparadas com as plantas não supridas com Si (Fig. 1B e 2B). A A foi menor em todas as épocas de avaliações nas plantas inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal (Fig. 1C) e nas plantas da cultivar BRS Buriti (Fig. 1D) em relação as plantas não inoculadas, porém foram superiores as plantas não supridas com Si (Fig. 1C e D).

Houve decréscimo em g_s nas plantas inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal (Fig. 2C) e nas plantas da cultivar BRS Buriti (Fig. 2D), quando comparadas com as plantas não-inoculadas, porém esses decréscimos foram maiores nas plantas não supridas com Si.

A E aumentou significativamente nas plantas não-inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal aos 0, 12, 15 e 18 dai (Fig. 3A), e nas plantas da cultivar BRS Buriti aos 0, 15, 18 e 21 dai (Fig. 3B), quando comparadas com as plantas não supridas com Si. A E decresceu nas plantas inoculadas e não-supridas com Si da cultivar NuOpal (Fig. 3C), e nas plantas da cultivar BRS Buriti (Fig. 3D).

A razão C_i/C_a aumentou significativamente nas plantas não-inoculadas e não supridas com Si da cultivar NuOpal aos 12, 18 e 21 dai (Fig. 4A), e nas plantas da cultivar BRS Buriti aos 15 e 18 dai (Fig. 4B) quando comparadas com as plantas supridas com Si. Houve decréscimo na razão C_i/C_a nas plantas inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal (Fig. 4C) e nas plantas da cultivar BRS Buriti (Fig. 4D) em relação as plantas não inoculadas das duas cultivares, porém esses decréscimos foram maiores nas plantas não supridas com esse elemento.

A A/C_i aumentou significativamente nas plantas não-inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal aos 12 e 15 dai (Fig. 5A) e nas plantas da cultivar BRS Buriti aos 12 e 21 dai (Fig. 5B) em relação às plantas não supridas com Si. Houve decréscimo na A/C_i nas plantas inoculadas e supridas com Si da cultivar NuOpal (Fig. 5C) e da cultivar BRS Buriti (Fig. 5D) em relação as plantas não inoculadas dessas cultivares, porém os decréscimos foram maiores nas plantas não supridas com Si.

3.3 Concentrações de pigmentos

Houve efeito significativo do fator blocos para as variáveis concentração de cl_b e cl_a/cl_b (Tabela 2).

Nas plantas da cultivar NuOpal supridas com Si, houve aumento significativo na concentração de cl_a aos 18 e 21 dai (Fig. 6A), na concentração de cl_b apenas aos 21 dai (Fig. 6B), na relação cl_a/cl_b aos 0, 12 e 18 dai (Fig. 6C) e na concentração de carotenóides aos 0, 12 e 18 dai (Fig. 6D) em relação às plantas não supridas com Si.

Nas plantas cultivar BRS Buriti supridas com Si, a concentração de cl_a e de cl_b aumentou significativamente apenas aos 18 dai (Fig. 7A e B), houve redução da relação cl_a/cl_b (Fig. 7C) e para a concentração de carotenóides, os maiores valores foram aos 12 dai (Fig. 7D) em relação às plantas não supridas com Si.

3.4 Correlação de Pearson

Houve correlação negativa significativa entre a AACPMR e as variáveis A , g_s , E , C_i/C_a nas plantas supridas com Si das duas cultivares (Tabelas 3 e 4). A correlação entre a AACPMR e A/C_i nas plantas supridas com Si para as duas cultivares foi positiva significativa (Tabelas 3 e 4).

4. Discussão

Tem sido amplamente documentados na literatura para diversas doenças de plantas a ocorrência de decréscimos da fotossíntese sob condições de estresse (Berger et al., 2007; Chou et al., 2000). No presente estudo, o decréscimo dos parâmetros de trocas gasosas A , g_s e E confirmaram o efeito negativo da infecção por *R. areola* no aparato fotossintético das plantas de algodão, pois após o aparecimento dos sintomas da mancha de ramulária nas plantas de algodão, houve diminuição da taxa de fotossíntese. No entanto, os maiores valores dos parâmetros de trocas gasosas foram observados nas plantas supridas com Si e por consequência houve uma redução da AACPMR em relação às plantas não supridas com esse elemento, fortalecendo a hipótese de que esse elemento pode impactar positivamente ou minimizar os danos causados pelo patógeno *R. areola* em plantas de algodão. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos encontrados por Xavier Filha et al. (2011), os quais observaram redução na área abaixo da curva de progresso da brusone (AACPB) em plantas de trigo supridas com Si.

Sabe-se que o decréscimo em A pode ocorrer logo após a infecção por patógenos e aliado a uma menor g_s são restrições primordiais por consequência da alteração no aparato fotossintético das plantas doentes (Berger et al., 2007). Reduções na magnitude ou nos valores dos parâmetros fotossintéticos limitam o influxo de CO_2 às folhas (Dallagnol et al., 2011). É provável que a atividade de enzimas envolvidas na fixação do CO_2 tenha sido comprometida, pois o efeito da infecção por *R. areola* nas variáveis relacionadas com as trocas gasosas foi maior nos estádios avançados da infecção. A redução na transpiração pode está relacionada com a destruição da cutícula, dos estômatos e rompimento do limbo foliar que afetam diretamente a g_s nas plantas doentes. Bastiaans (1993) observou que a infecção por *Magnaporthe grisea*, nas plantas de arroz, reduziu a fotossíntese e o tecido verde da folha ao redor das lesões devido a uma redução na área foliar verde. Já nas folhas de trigo infectadas por *Puccinia coronata*, a fotossíntese foi drasticamente inibida, indicando que o aparelho fotossintético foi severamente danificado (Scholes & Rolfe, 1996). Pode-se, então,

sugerir que reduções em A decorrentes da infecção por *R. areola* em plantas de algodão estão relacionadas com as limitações no influxo de CO_2 e a fixação de CO_2 à nível dos cloroplastos.

Danos nos fotossistemas do aparato fotossintético em decorrência da infecção por *R. areola* em plantas de algodão pode ter contribuído para os baixos valores dos parâmetros de trocas gasosas, principalmente A e g_s na presença ou não de Si nas plantas inoculadas pelo patógeno. Decréscimos paralelos em A e g_s mostram que o fechamento estomático esteve envolvido na redução da fotossíntese durante o processo infeccioso da *R. areola*. Em outros patossistemas observa-se um decréscimo no transporte de elétrons da cadeia fotossintética, indicando redução na eficiência do uso da luz e por consequência, um acréscimo no excesso de energia de excitação (Butler, 1978).

As plantas supridas com Si inoculadas com *R. areola* apresentaram valores ligeiramente maiores de A e g_s em comparação às plantas que não receberam o fornecimento desse elemento. Todavia, estes valores foram inferiores em comparação aos observados nas plantas não inoculadas com *R. areola*. Então, os parâmetros de trocas gasosas podem está relacionados entre si, permitindo um maior influxo de CO_2 , resultando em menores valores de E . Isso pode ser um reflexo da menor g_s , demonstrando que houve uma menor perda de vapor d'água em relação às plantas não supridas com esse elemento. O acúmulo de Si proporciona uma proteção mecânica à epiderme aumentando a resistência à seca, fazendo com que o Si acumulado nas lâminas foliares forme uma dupla camada de sílica-celulose. Como consequência, há uma diminuição da permeabilidade do vapor de água, o que limita a perda de água através da cutícula (Ma et al., 2001).

Os resultados do presente estudo foram contrários aos obtidos por Agarie et al. (1998), os quais encontraram menor taxa de transpiração em plantas de arroz supridas com Si. Mas, semelhantes aos de Hattori et al. (2005) que observaram maior taxa de transpiração, condutância estomática em plantas de sorgo submetidas a déficit hídrico e supridas com Si, em relação as plantas não supridas com esse elemento. É possível que o fornecimento de Si tenha colaborado para aumentar a resistência das duas cultivares, reduzindo os danos ocasionados pela mancha de ramulária e simultaneamente aumentando as taxas fotossintéticas. Provavelmente o fornecimento do Si tenha uma relação positiva com aumento na A e na redução das taxas transpiratórias. Pode-se inferir que as reduções em A provocadas pela infecção por *R. areola* em plantas de

algodão estão relacionadas a limitações no influxo de CO₂ nas folhas, mas também com limitações bioquímicas para a fixação de CO₂ à nível de cloroplasto.

No presente estudo, a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno reduziu a concentração dos pigmentos nas plantas de algodão, principalmente para a cultivar NuOpal. Observou-se que nesta cultivar, as concentrações de cl_a e cl_b foram inferiores nas plantas inoculadas que não receberam o fornecimento do Si, porém os carotenóides foram os que sofreram menor alteração. Nas plantas que receberam Si estas concentrações foram maiores apenas nos estádios mais avançados da infecção. 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 AACPMR. Estes resultados diferem com os obtidos por Dallagnol et al., (2011), os quais mostraram que em estádios mais avançados da infecção por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz ocorreram reduções nas concentrações de cl_a , e cl_b . Esses resultados são normalmente esperados quando ocorre a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno.

Considerando que a degradação de cl_a não foi manifestada sob forma de lesões necróticas nas plantas inoculadas não supridas com Si da cultivar NuOpal, é possível que tal degradação seja uma estratégia de regulação da absorção e transferência de energia luminosa entre fotossistemas, evitando ou atenuando uma super-redução da cadeia fotoquímica da fotossíntese que favorece a produção de ERO (Munné-Bosch & Alegre, 2000). Além disso, o fechamento estomático, devido à redução na g_s , interfere na cadeia de transferência de elétrons e reduz a entrada de CO₂ nos cloroplastos durante o ciclo de Calvin. Com isso, haverá excesso de NADPH e os elétrons originários da quebra da molécula de água no fotossistema II não terão disponíveis NADP⁺ para reduzi-lo. Assim, haverá um forte aumento na quantidade de elétrons, que por sua vez, provocarão foto-oxidação da clorofila nas antenas do fotossistema (Bacelar et al., 2006). Chen et al. (2011) mostraram aumento nas concentrações de clorofilas em plantas de arroz, sob estresse hídrico. Isso pode ter alguma relação com a maior eficiência fotoquímica das plantas.

Todavia, os resultados indicam que as plantas de algodão supridas com Si foram pouco eficientes nas suas concentrações de cl_a , cl_b e carotenóides, principalmente para a cultivar BRS Buriti. Nessa cultivar as concentrações de pigmentos foram contrárias ao que se espera no sistema fisiológico sob condições de estresse.

Os resultados do presente estudo sugerem que o Si pode estar envolvido nas atividades fisiológicas das plantas de algodão infectadas por *R. areola*, principalmente por minimizar os danos causados no sistema fotossintético. Na presença desse elemento houve a potencialização de *A* devido ao aumento na g_s , além de redução na *E*. Mesmo que as diferenças significativas entre *A* e g_s tenham sido pequenas entre as plantas supridas ou não com Si, esse elemento foi eficiente durante o processo infeccioso, contribuindo assim para uma maior resistência à mancha de ramulária.

5. Referências

- AGARIE, S.; UCHIDA, H.; AGATA, W.; KUBOTA, F.; KAUFMAN, P.B. Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Plant Production Science**, v.1, p.89-95, 1998.
- ALVES, A.A.; GUIMARÃES, L.M.S.; CHAVES, A.R.M.; DAMATTA, F.M.; ALFENAS, A.C. Leaf gas Exchange and chlorophyll a fluorescence os *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 33, p.1831-1839, 2011.
- ANDRADE, P.M.C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Controle químico de doenças em algodão no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p.262-265, 1999.
- AQUINO, L.A.; BERGER, P.G.; RODRIGUES, F.A.; ZAMBOLIM, L.; HERNANDEZ, J.F.R.; MIRANDA, L.M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramulária do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.361-363, 2008.
- 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. Immediate responses and adptative strategies of three olive cultivars under constranting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. **Plant Science**, v.170, p.596-605, 2006.
- BASTIAANS, L. Effects of leaf blast on photosynthesis of rice. Leaf photosynthesis. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.99, p.197-203, 1993.
- BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.4019-4026, 2007.

BUTLER, W.L. Energy Distribution the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v.29, p.345-378, 1978.

CHEN, W.; YAO, X.; CAI, K.; CHEN, J. Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. **Biological Trace Elements Residuos**, v.142, p.67-76, 2011.

CHOU, H.; BUNDOCK, N.; ROLFE, S.A.; SCHOLES, J.D. Infection of Arabidopsis thaliana leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. **Molecular Plant Pathology**, v.1, p.99-113, 2000.

DALLAGNOL, L.J.; RODRIGUES, F.A.; MARTINS, S.C.V.; CAVATTE, P.C.; DAMATTA, F.M. Alterations on Rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Australasian Plant Pathology**, v.40, p.360-365, 2011.

DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: DATNOFF LE, ELMER WH, HUBER DM. (eds) **Mineral Nutrition and Plant Disease**. St Paul, MN, EUA, APS Press, p.233-246, 2007.

EGERT, M.; TEVINI, M. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). **Environmental and Experimental Botany**, v.48, p.43-49, 2002.

FAUTEUX, F.; CHAIN, F.; BELZILE, F.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.103, p.17554-17559, 2006.

FOYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNER, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v.17, p.507-523, 1994.

HATTORI, T.; INANAGA, S.; ARAKI, H.P.; MORITA, S.; LUXOVA, M.; LUX, A. Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. **Physiologia Plantarum**, v.123, p.459-466, 2005.

INAMULLAH, K.; ISODA, A. Adaptative responses of soybean and cotton to water stress. **Plant Production Science**, v.8, p.16-26, 2005.

ISAMIL, M.R.; YUSOFF, M.K.; MAHMOOD, M. Growth, water relations, stomatal conductance and proline concentration in water stressed banana (*Musa* sp) plant. **Asian Journal of Plant Science**, v.3, p.709-713, 2004.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Cir. 32. 1950.

- KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; NOLLA, O.A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia, MG, Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia. 2004. 34 p.
- KRAUSE, G.H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. **Physiologia Plantarum**, v.74, p.566-574, 1988.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, SP: RiMa, 2004. 531 p.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: DOUCE, R., PACKER, L. (Eds) **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-381, 1987.
- LICHTENTHALER, H.K.; MIEHÉ, J.A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, v.2, p.316-320, 1997.
- MA, J.F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic abiotic stresses. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.50, p.11-18, 2004.
- MA, J.F., MIYAKE, Y., TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L. E., SNEDER, G. H., KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture Elsevier Science**. p.17-39, 2001.
- Ma, J.F.; Takahashi, E. Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan. **Elsevier Science**. 2002. 274 p.
- MARRUR, C.J.; RUANO, O. A reference system of determination of cotton plant development. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 5, p.313-317, 2001.
- MATSUDA, R.; OHASHI-KANEKO, K.; FUJIWARA, K.; GOTO, E.; KURATA, K. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.1870-1874, 2004.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Role of dew on the recovery of water-stressed *Melissa officinalis* L. plants. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.759-766, 1999.
- OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of sun and shade plants. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. **Photoinhibition and photosynthesis: from molecular mechanisms to the field**, v.1, p.1-24, 1994.
- PAULSEN, H. Chlorophyll a/b – binding proteins. **Photochemistry and Photobiology**, v.62, p.367-382, 1995.
- SANDMANN, G.; SCHEER, H. Chloroplast pigments: chlorophylls and carotenoids. In: **Photosynthesis, a comprehensive treatise**. 1998. 376 p.

- SCHOLES, J.; ROLFE, S.A. Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. **Planta**, v.199, p.573-582, 1996.
- SEEBOLD, K.W.; KUCHARAK, T.A.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, J.F.; MARCHETTI, M.A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. **Phytopathology**, v.91, p.63-69, 2001.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1056, 1977.
- Sistema de análises estatísticas e genéticas - **SAEG**. (2007). Viçosa: UFV, (Versão 9.1)
- SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E. C. (2 Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**, Brasília, p. 567-612, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 843 p.
- VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v.153, p.376-387, 1981.
- XAVIER FILHA, A.A.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K.; HODGES, C.S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, v.30, p.277-281, 2001.

Tabela 1 - Área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) e concentração foliar de Si nas folhas das plantas de algodão das cultivares BRS Buriti e NuOpal cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*.

Fatores		
Doses de Si	AACPMR	Si (dag/kg)
-Si	91,34	0,44
+Si	61,35	0,63
Teste- <i>t</i>	21,17*	0,08*
Cultivares		
BRS Buriti	85,32	0,41
NuOpal	66,13	0,56
Teste- <i>t</i>	24,11**	0,21 ^{ns}
C.V. (%)	32,23	23,26
Valores de <i>F</i>		
Cultivares (C)	34,21**	4,13 ^{ns}
Silício (Si)	41,29**	91,28**
C × Si	5,91*	3,18*
C.V. (%)	14,17	32,79

C.V. = coeficiente de variação; ^{ns} = não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste-*t*.

Tabela 2 – Valores de *F* obtidos da 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 CO₂ (C_i/C_a), eficiência intrínseca da fotossíntese (A/C_i), concentração de clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b), carotenóides (*Carot*) e razão entre clorofilas a/b (Cl_a/Cl_b) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal e BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício e inoculadas ou não com *Ramularia areola*.

Fonte de Variação	<i>A</i>	g_s	<i>E</i>	C_i/C_a	A/C_i	Cl_a	Cl_b	<i>Carot</i>	Cl_a/Cl_b
Blocos	5,89*	2,97*	1,75*	2,79*	7,07*	1,27 ^{ns}	2,85*	0,62 ^{ns}	3,42*
Cultivares (C)	125,36*	78,09**	37,35*	2,31 ^{ns}	0,48 ^{ns}	1,26 ^{ns}	3,78 ^{ns}	0,02 ^{ns}	1,27 ^{ns}
Inoculação (I)	446,15**	503,16*	77,37*	1,62 ^{ns}	39,35*	0,28 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,23 ^{ns}	2,62 ^{ns}
Doses de Silício (Si)	46,77**	47,96**	34,48*	2,04 ^{ns}	8,00*	0,60 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,89 ^{ns}
C × I5	154,95**	154,55**	1,23 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,24 ^{ns}	1,37 ^{ns}	3,54 ^{ns}	0,31 ^{ns}	2,29 ^{ns}
C × Si	1,98 ^{ns}	4,46*	8,14*	0,79 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,56 ^{ns}	1,30 ^{ns}	1,78 ^{ns}
I × Si	8,84**	7,48*	10,55*	1,06 ^{ns}	0,24 ^{ns}	2,03 ^{ns}	1,46 ^{ns}	1,96 ^{ns}	0,01 ^{ns}
C × I × Si	11,85**	30,71*	8,05*	1,41 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}	1,84 ^{ns}	1,02 ^{ns}	3,24 ^{ns}
C.V. (%)	12,75	24,24	14,25	18,28	13,46	21,02	32,41	37,85	20,19

** 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

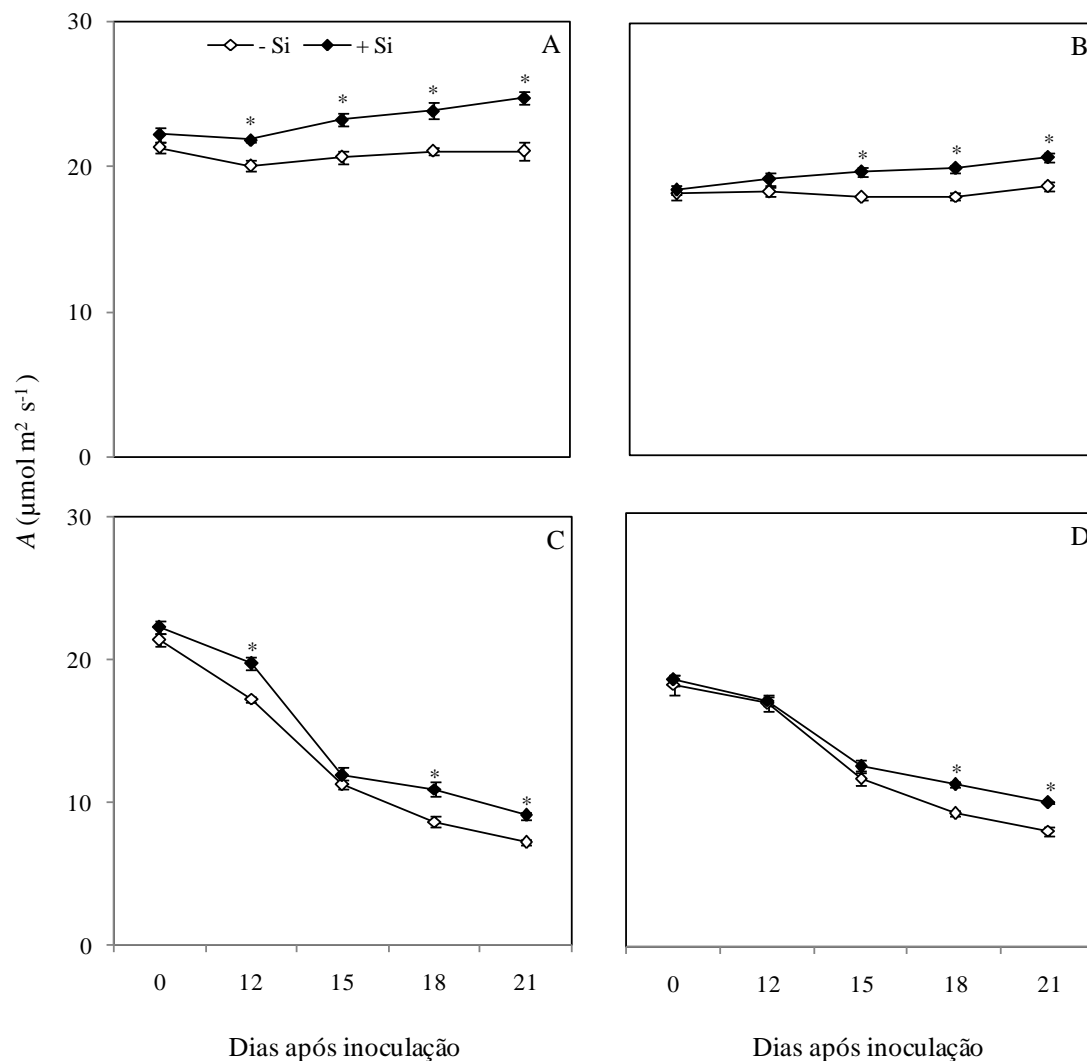


Figura 1. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A e C) e BRS Buriti (B e D) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$.

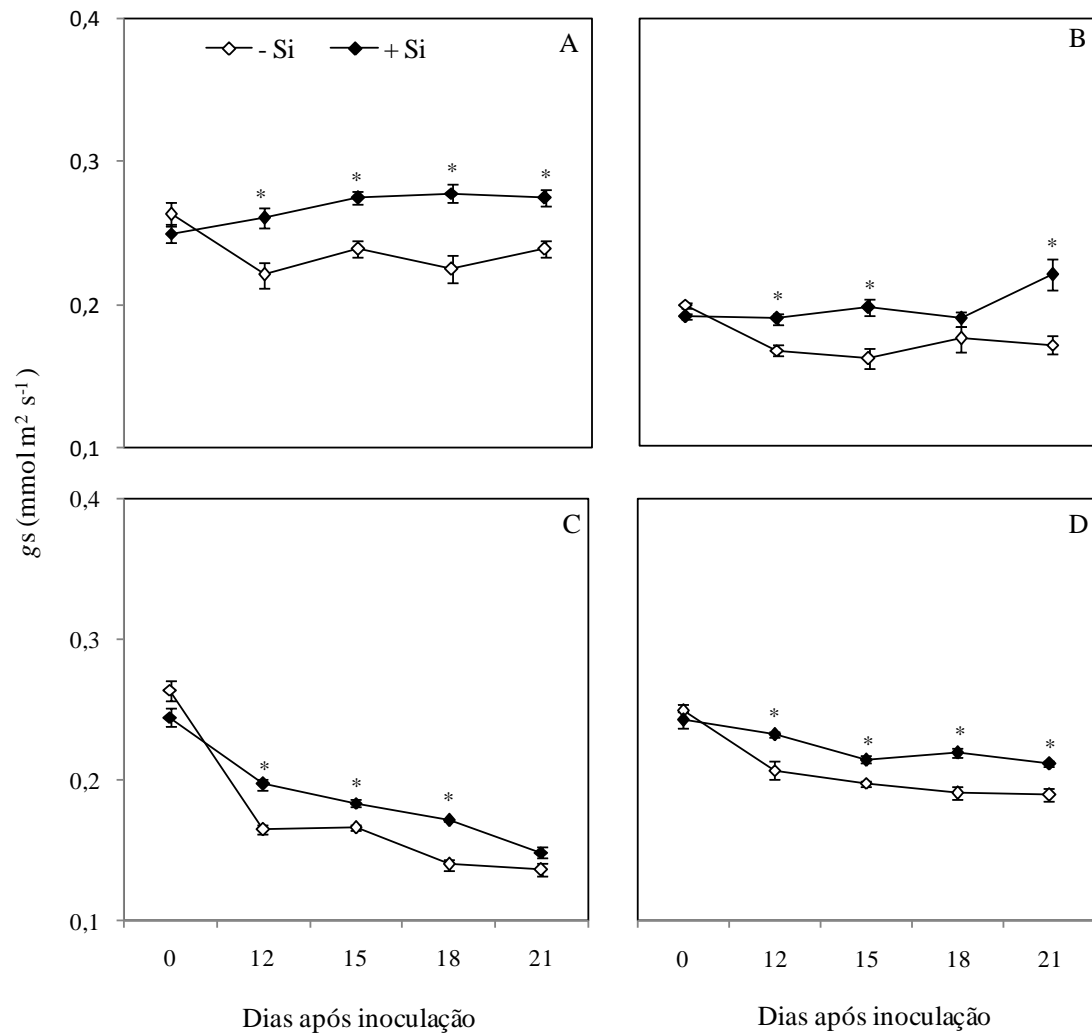


Figura 2. Condutância estomática (g_s) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A e C) e BRS Buriti (B e D) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$.

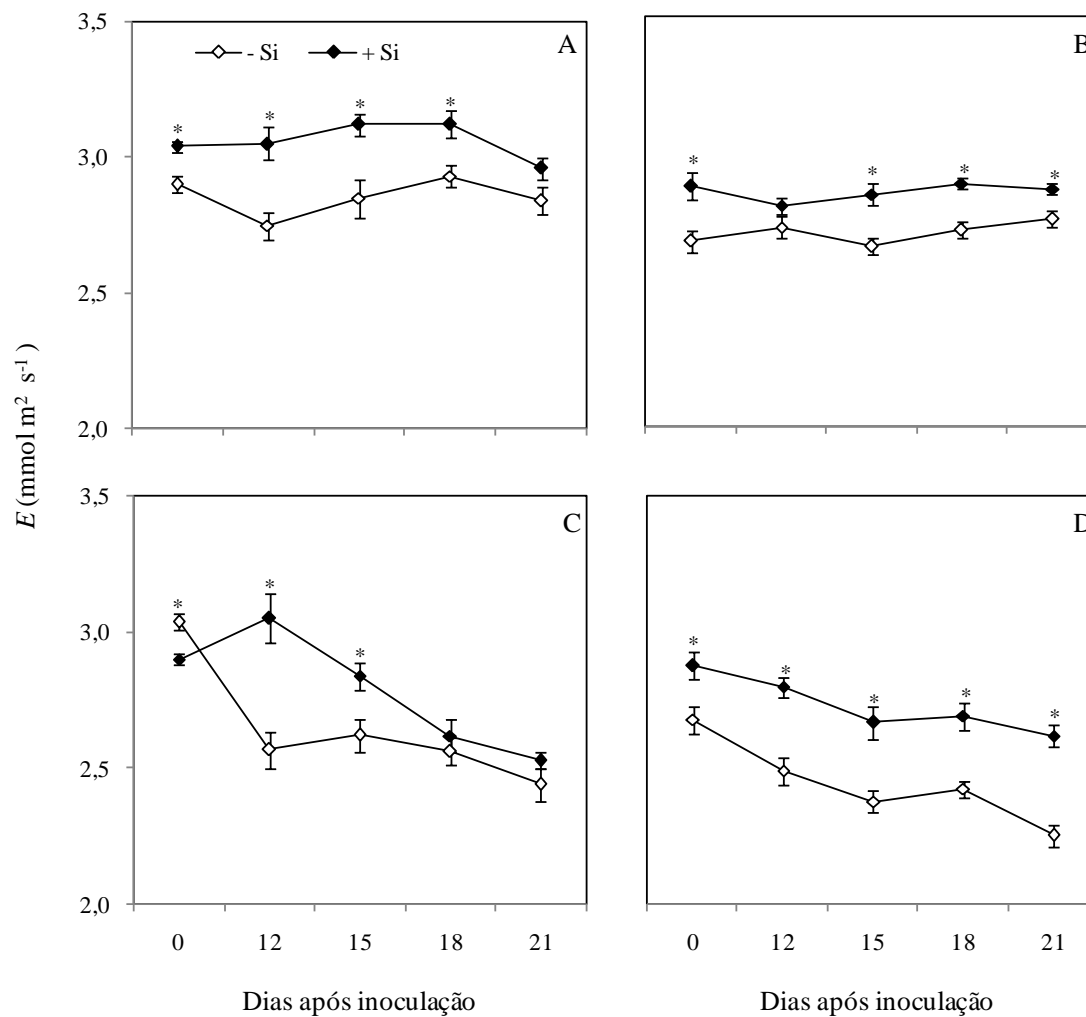


Figura 3. Taxa de transpiração (E) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A e C) e BRS Buriti (B e D) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste- t . $n = 10$.

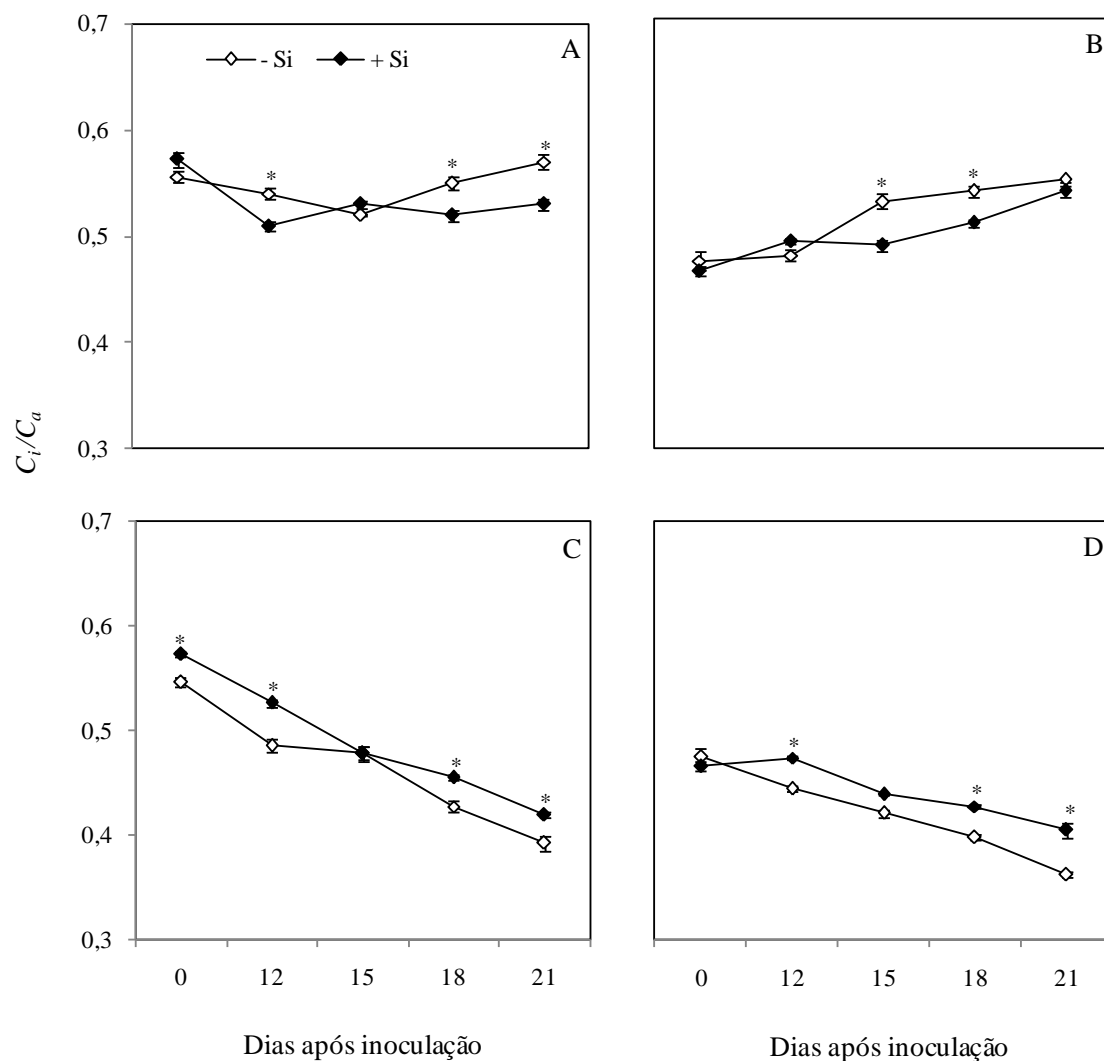


Figura 4. Razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A e C) e BRS Buriti (B e D) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$.

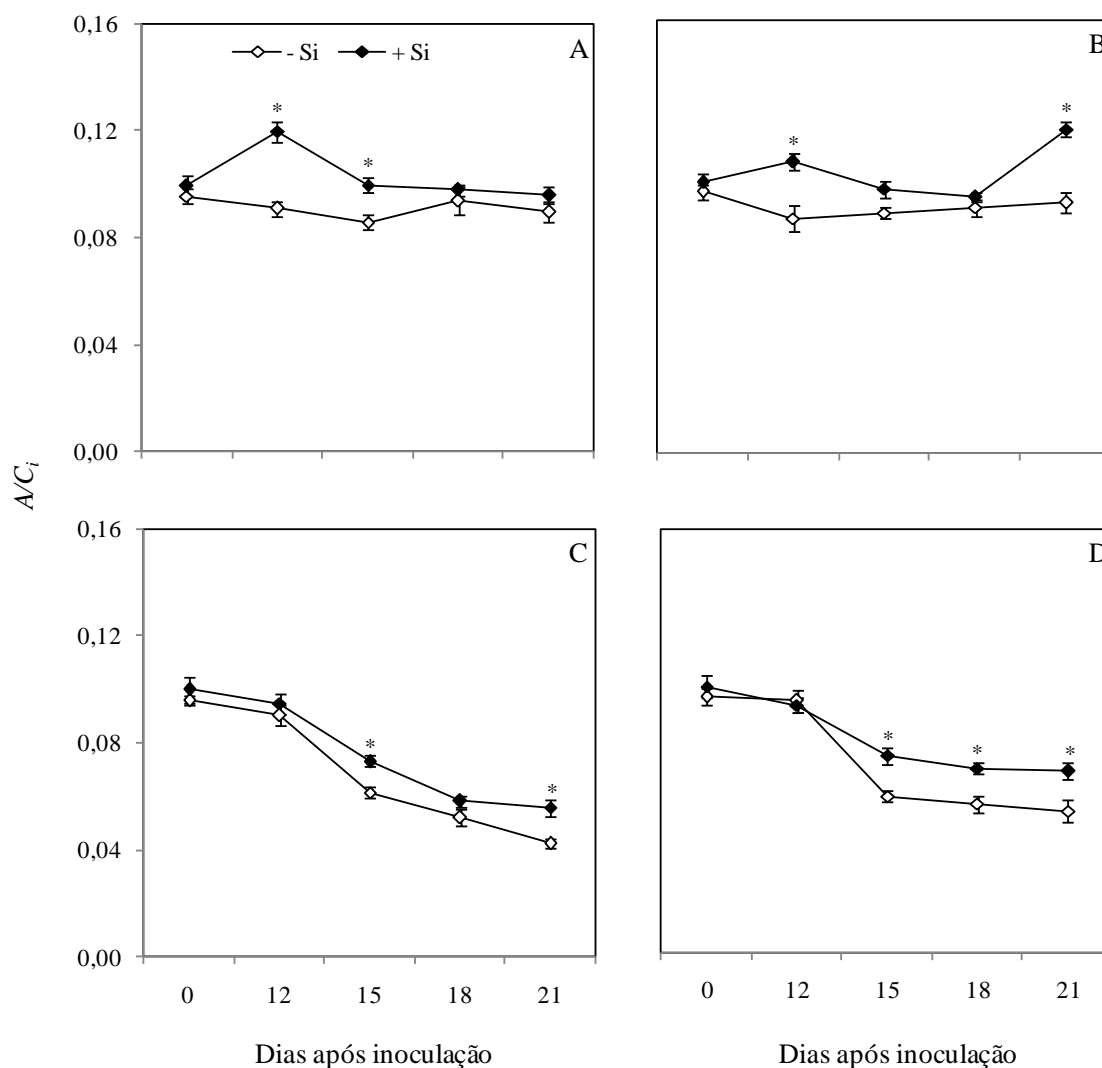


Figura 5. Eficiência intrínseca da fotossíntese (A/C_i) em folhas de plantas de algodão das cultivares NuOpal (A e C) e BRS Buriti (B e D) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$.

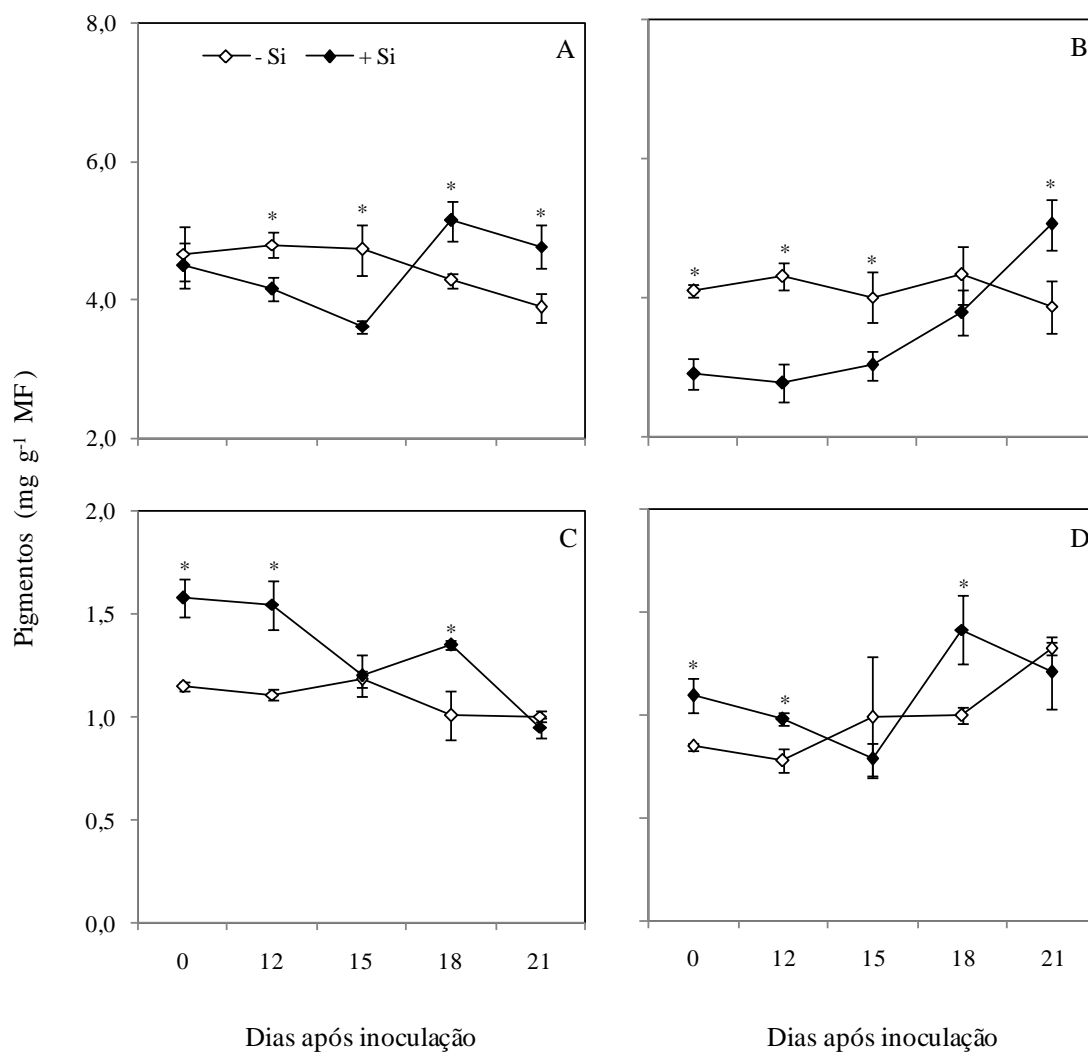


Figura 6. Concentrações de clorofila *a* (cl_a) (A), clorofila *b* (cl_b) (B), razão clorofila *a/b* (C) e concentração de carotenóides (D) em folhas de plantas de algodão da cultivar NuOpal cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$. MF = massa fresca.

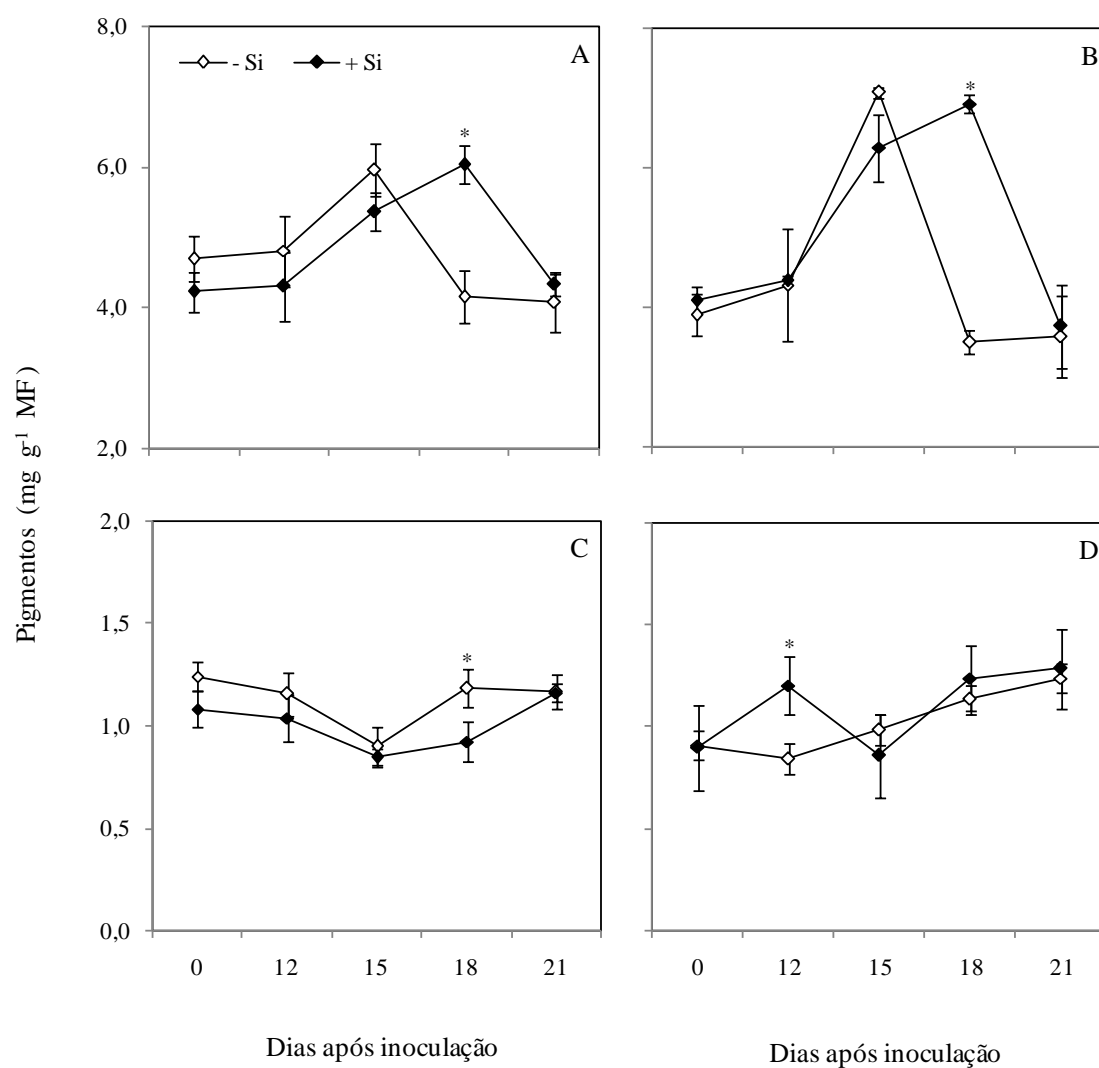


Figura 7. Concentrações de clorofila *a* (cl_a) (A), clorofila *b* (cl_b) (B), razão clorofila *a/b* (C) e concentração de carotenóides (D) em folhas de plantas de algodão da cultivar BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste-*t*. $n = 10$. MF = massa fresca.

Tabela 3. 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), eficiência intrínseca da fotossíntese (A/C_i), área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) avaliadas nas plantas de algodão da cultivar NuOpal supridas com silício e inoculadas com *Ramularia areola*.

Variáveis	A	g_s	E	C_i/C_a	A/C_i	AACPMR
A	-	0,91*	0,83*	0,97*	0,97*	-0,85*
g_s	0,0142	-	0,84*	0,97*	0,89*	-0,90*
E	0,0370	0,0369	-	0,88*	0,92*	-0,97*
C_i/C_a	0,0021	0,0020	0,0221	-	0,96*	-0,91*
A/C_i	0,0021	0,0189	0,0130	0,0035	-	0,89*
AACPMR	0,0033	0,0001	0,0012	0,0002	0,0001	-

^{ns} = não significativo, * = significativo a $P \leq 0,05$.

Tabela 4. 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), eficiência intrínseca da fotossíntese (A/C_i), área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) avaliadas nas plantas de algodão da cultivar BRS Buriti supridas com silício e inoculadas com *Ramularia areola*.

Variáveis	A	g_s	E	C_i/C_a	A/C_i	AACPMR
A	-	0,98*	0,94*	0,94*	0,99*	-0,92*
g_s	0,0006	-	0,89*	0,92*	0,99*	-0,86*
E	0,0083	0,0203	-	0,87*	0,92*	-0,93*
C_i/C_a	0,0067	0,0128	0,0246	-	0,91*	-0,96*
A/C_i	0,0001	0,0001	0,0133	0,0157	-	0,88*
AACPMR	0,0010	0,0001	0,0010	0,0001	0,0001	-

^{ns} = não significativo, * = significativo a $P \leq 0,05$.

CONCLUSÕES FINAIS

Conclui-se que a partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que o fornecimento de Si às plantas de algodão pode aumentar a resistência contra a mancha de ramulária, estando envolvido em atividades metabólicas, na ativação de algumas enzimas envolvidas na defesa da planta a patógenos e na produção de compostos de defesa, reduzindo assim a severidade da doença em folhas de plantas de algodão, além de minimizar as alterações na fisiologia das plantas de algodão.