

Mecanismos bioquímicos da defesa do algodoeiro à mancha de ramulária mediados pelo silício

Carmen Rosa da Silva Curvêlo (^{1*}); Fabrício Ávila Rodrigues (²); Leandro de Castro Silva (²); Kelly Juliane Telles Nascimento (²); Paulo Geraldo Berger (¹)

(¹) Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitotecnia, 36570-000 Viçosa (MG), Brasil.

(²) UFV, Departamento de Fitopatologia, 36570-000 Viçosa (MG), Brasil.

(* Autor correspondente: carmencurvelo@yahoo.com.br

Recebido: 13/dez./2012; Aceito: 18/fev./2013

Resumo

Esse estudo investigou o efeito do silício (Si) na resistência do algodoeiro à mancha de ramulária (*Ramularia areola*). Plantas de algodoeiro (cvs. NuOpal e BRS Buriti) foram cultivadas em solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) e 2 mM Si L⁻¹ (+Si) e aos 30 dias após emergência foram submetidas à inoculação com uma suspensão de conídios de *R. areola*. Avaliou-se o período de incubação (PI), o período latente (PL₆₀), a severidade, o número de lesões (NL) por cm² de folha, o tamanho de lesão (TL), a concentração foliar de Si e as atividades das enzimas de defesa peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), quitinases (QUI), β-1,3-glucanases (GLU) e fenilalanina amônia-liases (FAL). Os dados de severidade foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR). A concentração foliar de Si aumentou em 64% nas plantas supridas com Si em relação às não supridas com esse elemento. Houve aumentos de 10% e 14,7%, respectivamente, para o PI e o PL₆₀ nas plantas supridas com Si. Reduções de 38,6% e 62,4% para o NL e de 17,2% e 26,6% para o TL ocorreram, respectivamente, nas plantas das cvs. NuOpal e BRS Buriti supridas com Si. Houve redução de 35% na AACPMR para as plantas supridas com Si em relação às não supridas. A concentração de compostos fenólicos solúveis totais nas plantas das duas cultivares supridas com Si foi maior aos 21 dias após inoculação (dai) em relação às não supridas com esse elemento. A concentração dos derivados da lignina foi maior dos 15 aos 21 dai apenas para as plantas da cv. BRS Buriti supridas com Si. A atividade da POX foi maior nas plantas das duas cultivares supridas com Si em relação às não supridas com esse elemento dos 15 aos 21 dai. Paras as plantas da cv. NuOpal supridas com Si, as atividades da PFO, QUI, GLU e FAL aumentaram aos 18 dai. As atividades da PFO e da FAL nas plantas da cv. BRS Buriti não foram potencializadas pelo Si. Nas plantas da cv. BRS Buriti supridas com Si, houve aumento nas atividades da QUI e da GLU aos 21 dai em relação às não supridas com Si. Conclui-se que a resistência do algodoeiro à mancha de ramulária foi bioquimicamente potencializada pelo Si, principalmente para as plantas da cv. NuOpal consideradas suscetíveis à mancha de ramulária.

Palavras-chave: enzimas de defesa, mecanismos de defesa, nutrição mineral.

Biochemical aspects of cotton resistance to ramularia leaf spot mediated by silicon

Abstract

This study investigated the effect of silicon (Si) on cotton resistance to ramularia leaf spot (*Ramularia areola*). Plants of cotton (cvs. NuOpal and BRS Buriti) were grown in nutrient solution containing 0 (+Si) or 2 mM Si L⁻¹ (-Si) and inoculated with a conidial suspension of *R. areola* at 30 days after emergence. The incubation period (IP), latent period (LP₆₀), severity, number of lesions (NL) per cm² of leaf area, lesion size (LS), foliar Si concentration and the activities of defense enzymes peroxidases (POX), polyphenoloxidasas (PPO), chitinases (CHI), β-1,3-glucanases (GLU), and phenylalanine ammonia-lyases (PAL) were evaluated. Data from severity were used to calculate the area under ramularia leaf spot progress curve (AURLSPC). Leaf Si concentration increased by 64% on plants supplied with Si compared to plants not supplied with this element. There were increases of 10 and 14.7% for IP and LP₆₀, respectively, on plants supplied with Si. Reductions of 38.6 and 62.4% for NL and 17.2 and 26.6% for LS occurred, respectively, for plants from NuOpal and BRS Buriti cvs supplied with Si. AURLSPC was reduced by 35% for the +Si treatment compared to the -Si treatment. The concentration of total soluble phenolic compounds on plants of both cv. supplied with Si increased during the progress of ramularia, but the lowest values occurred for the -Si treatment until 18 days after inoculation (dai). The increase on the concentration of lignin derivatives was significant only for plants of cv. BRS Buriti infected by *R. areola* and supplied with Si. POX activity was higher on plants from the two cultivars supplied with Si compared to plants not supplied with this element. For plants of cv. NuOpal supplied with Si, PPO, CHI, GLU, and PAL activities increased until 18 dai, but the activities of PAL and PPO on plants of cv. BRS Buriti were not potentiated by Si. On plants from cv. BRS Buriti supplied with Si, there was increase on CHI and GLU activities at 21 dai compared to plants not supplied with Si. It can be concluded that cotton resistance to ramularia leaf spot was biochemically enhanced by Si, especially for plants of cv. NuOpal considered susceptible to ramularia leaf spot.

Key words: defense enzymes, mechanisms of defense, mineral nutrition.

1. INTRODUÇÃO

A mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* (Atk.), é uma das principais doenças foliares do algodoeiro e ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de algodão do Brasil (SUASSUNA e COUTINHO, 2011). Essa doença causa danos de até 50% na produção de algodão em diversos Estados brasileiros, quando não são adotadas medidas de controle eficazes (ANDRADE et al., 1999). A principal estratégia de controle dessa doença é o uso de fungicidas, visto que a maioria das cultivares de algodoeiro não possuem resistência genética à doença (SUASSUNA e COUTINHO, 2011).

O uso do silício (Si) representa uma alternativa viável no manejo de várias doenças em espécies de dicotiledôneas (DATNOFF et al., 2007), e apesar de não ser considerado elemento essencial às plantas superiores, pode ser absorvido em níveis que ultrapassam os macronutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio (EPSTEIN, 1999). O papel do Si nas plantas tem sido cada vez mais estudado pelos pesquisadores devido aos seus inúmeros benefícios, principalmente quando as plantas estão sob condições de estresse (MA, 2004). Do ponto de vista morfológico, a deposição e polimerização do ácido monossilícico abaixo da cutícula forma uma camada dupla cutícula-sílica que impede ou atrasa a penetração de alguns patógenos (YOSHIDA, 1965). Outro mecanismo proposto é que o Si solúvel tenha um papel ativo, que potencializa mecanismos de defesa das plantas com o aumento na produção de compostos fenólicos, nos níveis de algumas classes de fitoalexinas e também na ativação de alguns genes que codificam proteínas PR (RODRIGUES et al., 2005). Além disso, o incremento na atividade de enzimas líticas à parede celular fúngica ou associadas com o metabolismo secundário da planta (LIANG et al., 2005) reforçam a hipótese de que o Si potencializa mecanismos de defesa em plantas e não atua apenas de forma passiva na resistência.

Informações a respeito do uso de potencializadores de resistência, como por exemplo, o Si, na atividade das enzimas de defesa como as peroxidases, responsáveis pelo reforço da parede celular através da deposição de lignina; polifenoloxidasas, que oxidam compostos fenólicos a moléculas mais reativas; quitinases e β -1,3-glucanases que degradam a parede celular de espécies fúngicas e a fenilalanina amônia-liase envolvida na rota dos fenilpropanóides (XU et al., 1998) ainda são incipientes na interação algodoeiro-*R. areola*. Diversos estudos relatam a potencialização de mecanismos de defesa tais como o aumento na concentração de compostos fenólicos e de fitoalexinas e na expressão de genes que codificam para proteínas relacionadas com a patogênese em plantas de arroz supridas com Si (RODRIGUES et al., 2005). Assim, este trabalho objetivou investigar o efeito do Si na resistência do algodoeiro à mancha de ramulária e os

aspectos bioquímicos possivelmente envolvidos com a resistência potencializada por esse elemento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da solução nutritiva e crescimento das plantas de algodoeiro

A solução nutritiva usada neste estudo foi preparada de acordo com HOAGLAND e ARNON (1950) com algumas modificações e constituída de: 6,0 mM KNO₃; 1,0 mM NH₄H₂PO₄; 2,0 mM MgSO₄.7H₂O; 4,0 mM Ca₂(NO₃)₂; 0,3 μ M CuSO₄.5H₂O; 1,3 μ M ZnSO₄.7H₂O; 46 μ M H₃BO₃; 12,6 μ M MnCl₂.4H₂O; 0,1 μ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 45 μ M FeSO₄.7H₂O e 45 μ M EDTA bisódico. O Si, fornecido como ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio através de 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 pH.

Sementes de algodoeiro das cvs. NuOpal e BRS Buriti foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 10% por 2 minutos e, posteriormente, lavadas em água destilada por 3 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 \pm 0,5 empregando soluções de NaOH ou HCl (1 M) quando necessário.

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

Folhas de plantas de algodoeiro da cv. NuOpal com sintomas da mancha de ramulária foram coletadas no campo para obtenção do inóculo de *R. areola*. O inóculo foi preparado lavando as folhas em água destilada contendo gelatina (1% p/v) com auxílio de um pincel de cerdas macias para remoção dos conídios. Posteriormente, a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze estéril para retirar impurezas e ajustada para a concentração de 1,5 \times 10⁵ conídios mL⁻¹ com o auxílio de um hemacitômetro.

Aos 30 dias após emergência, plantas de algodoeiro nos estádios V4 e V5 (MARUR e RUANO, 2001) foram

submetidas à inoculação com a suspensão de conídios de *R. areola* com 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 $85 \pm 5\%$) por 48 horas e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C e umidade relativa de $60 \pm 10\%$, onde permaneceram até o fim do experimento.

Avaliação dos componentes de resistência e da severidade da mancha de ramulária

Nas quatro folhas, do ápice para a base, das plantas das repetições de cada tratamento, avaliou-se o período de incubação (PI), o período latente (PL_{60}), o número de lesões (NL) por cm^2 de folha, o tamanho de lesão (TL) e a severidade. O PI foi avaliado a cada 24 horas a partir do 8.º dia após inoculação (dai). O PL_{60} ocorreu quando 60% das dez lesões marcadas em cada folha esporularam. A severidade da mancha de ramulária foi avaliada por 21 dias com intervalos de três dias, tendo seu início a partir do 12.º 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 e FINNEY (1977). Após a última avaliação da severidade, as folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, digitalizadas (resolução de 400 dpi) e as imagens processadas no programa QUANT (VALE et al., 2001) para quantificar o NL e o TL, utilizando-se o procedimento de redução de cores por paleta.

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

Amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas aos 12, 15, 18 e 21 dai. Amostras de folhas das plantas não submetidas à inoculação com *R. areola* (0 h) serviram como controle. As amostras foram coletadas em nitrogênio 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 nitrogênio 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 horas em mesa agitadora (200 rpm)

em temperatura ambiente. O extrato etanólico foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos 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 e BEN-ZAKEN (1993), com algumas modificações, foi usado para determinar a concentração de CFST. Um volume de 150 μ L do reagente Fenol Folin-Ciocalteu 0,25 N (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi adicionado a 150 μ L do extrato metanólico e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, 150 μ L de carbonato de sódio (1 M) foi adicionado à mistura, seguida de agitação e mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. Logo após, 1 mL de água destilada foi adicionada à mistura que foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 1 hora. Foi determinada a absorbância da mistura em uma amostra de 500 μ L a 725 nm em espectrofotômetro. A concentração de CFST foi expressa em mg de compostos fenólicos (em termos de catecol) por g de massa foliar fresca. 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 destilada estéril foi adicionado ao resíduo obtido após a extração dos CFST. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o resíduo foi seco por 12 horas a 65 °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 e 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 °C por 4 horas. Posteriormente, os tubos de microcentrífuga foram colocados em gelo (4°C) por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada esterilizada e centrifugado novamente a 10.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1,5 mL de NaOH a 0,5 N. A mistura permaneceu por 12 horas em mesa agitadora (150 rpm) em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de HCl concentrado ao sobrenadante e os tubos de microcentrífuga transferidos para geladeira (4 °C) por 4 horas para precipitação dos derivados da LATG. Nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante 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 expressa em mg kg^{-1} de massa foliar fresca. Lignina alcalina éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, São Paulo) foi usada para a obtenção de uma curva-padrão.

Determinação da atividade de enzimas de defesa

Amostras da terceira, quarta e quinta folhas, do ápice para a base, das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas aos 12, 15, 18, 21 dai. Folhas coletadas de plantas não submetidas à inoculação (0 h) com *R. areola* serviram como controle. As folhas foram mantidas em N_2 líquido durante as coletas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até serem analisadas.

Atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7): o extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,4 g de folhas em almofariz com N_2 líquido seguida de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de 0,1 M tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático. A atividade da POX foi determinada conforme métodos propostos por CHANCE e MAEHLEY (1955) e KAR e MISHRA (1976). No ensaio colorimétrico, utilizou-se pirogalol como substrato e peróxido de hidrogênio. A cada 1 mL do extrato de reação, foram adicionados 340 μL de água destilada, 250 μL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 μL de pirogalol 100 mM, 200 μL de peróxido de hidrogênio 100 mM e 10 μL do extrato. As leituras de absorbância foram realizadas a 420 nm a cada 10 segundos durante 1 minuto em espectrofotômetro. A atividade da POX foi determinada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE e MAEHLEY, 1955) e expressa em mmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Atividade de polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1): o extrato enzimático foi semelhante ao obtido para determinação da POX. A atividade da PFO foi determinada conforme métodos propostos por CHANCE e MAEHLEY (1955) e KAR e MISHRA (1976). No ensaio colorimétrico, utilizou-se o pirogalol a 100 mM como substrato. A cada 1 mL do extrato de reação, foi adicionado 520 μL de água destilada, 250 μL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 μL de pirogalol 100 mM e 30 μL do extrato. As leituras de absorbância foram realizadas a 420 nm a cada 10 seg durante 1 min em espectrofotômetro. A atividade da PFO foi determinada utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE e MAEHLEY, 1955).

Atividade de quitinasas (QUI, EC 3.2.1.14): o extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,4 g de folhas em almofariz com nitrogênio líquido seguida de homogeneização em 2 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), 1 mM PMSF e 200 mg de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 25 minutos a 4°C e utilizando-se o sobrenadante no ensaio enzimático. A determinação da atividade da QUI foi realizada de acordo com o método proposto por ROBERTS e SELITRENNIKOFF (1988) e modificado 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^{-1}) e 20 μL do extrato vegetal foi incubado a 37°C por 2 horas. A reação foi paralisada acrescentando-se 500 μL de 50 mM acetato de sódio (pH 5,0). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 410 nm imediatamente após as reações serem paralisadas. Foi utilizado para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a atividade da QUI foi expressa em mmol de *p*-nitrofenil produzido por $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Atividade de β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.6): o extrato enzimático foi semelhante ao obtido para determinação da QUI. A atividade da GLU foi determinada conforme método descrito por LEVER (1972) com algumas modificações. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi usado em substituição à hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico. O meio de reação constituído de 230 μL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 250 μL da solução de laminarina (4 mg mL^{-1}) e 20 μL do extrato vegetal foi incubado a 45°C por 30 minutos. Após esse período, acrescentou-se ao meio de reação 500 μL de DNS e, em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento em gelo até a temperatura de 30°C , as amostras tiveram suas absorbâncias determinadas em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

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 em almofariz com N_2 líquido e a 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 g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram usados como substrato para determinar a atividade da FAL. A reação iniciou-se após adição de 0,5 mL do extrato à 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 hora. 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 absorvância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e utilizou-se o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965) para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

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

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 72 horas. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), com peneira de 40 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada de acordo com KORNDÖRFER et al. (2004).

Delineamento experimental e análise estatística

Foram desenvolvidos 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 em esquema fatorial 2×2 , sendo seis e quatro repetições para Exp. 1 e o Exp. 2 respectivamente. Os fatores estudados foram: duas cultivares de algodoeiro e duas doses de Si. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas de algodoeiro. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelos testes de Tukey ou *t* de Student ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAEG 9.1 (SAEG, 2007). A concentração foliar de Si foi correlacionada com os componentes de resistência e com a AACPMR.

3. RESULTADOS

Componentes de resistência, AACPMR e concentração foliar de Si

Houve efeito significativo do fator doses de Si para o PI, PL_{60} , AACPMR e concentração foliar de Si e da interação doses de Si \times cultivares para o NL e o TL. Houve aumento de 14% e 15,7% para o PI e PL_{60} , respectivamente, e redução de 35% na AACPMR nas plantas supridas com Si em relação às 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 74% e 36,4% e o TL em 80% e 58,7% nas plantas das cvs. NuOpal e BRS Buriti respectivamente, quando supridas com Si (Tabela 2). Houve diferença significativa entre as cultivares para o NL e o TL independente da presença de Si na solução nutritiva (Tabela 2).

A correlação entre a concentração foliar de Si com o PI e o PL_{60} 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, $p \leq 0,01$).

Tabela 1. Período de incubação (PI), período latente (PL_{60}), área abaixo da curva do progresso da mancha de ramulária (AACPMR) e concentração de Si nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal e BRS Buriti cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*

Variáveis				
Fatores Silício	PI (dias)	PL_{60} (dias)	AACPMR	Si (dag kg^{-1})
-Si	11,02	17,75	93,16	0,40
+Si	12,82	20,54	63,22	0,56
Teste t	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 t	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 pelo teste t ($p \leq 0,05$) respectivamente.

Tabela 2. Número de lesões (NL) por cm^2 de folha e tamanho de lesão (TL) nas folhas das plantas de algodoeiro 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	7,61 Ba	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 ($p \leq 0,05$). C.V. : coeficiente de variação.

Concentrações de CFST e derivados da LATG

A concentração de CFST aumentou significativamente em 12% e 8% aos 18 dai nas plantas das duas cultivares não supridas com Si e submetidas à inoculação com *R. areola* em relação às plantas supridas com esse elemento (Figura 1a,b). Nas plantas das cvs. NuOpal e BRS

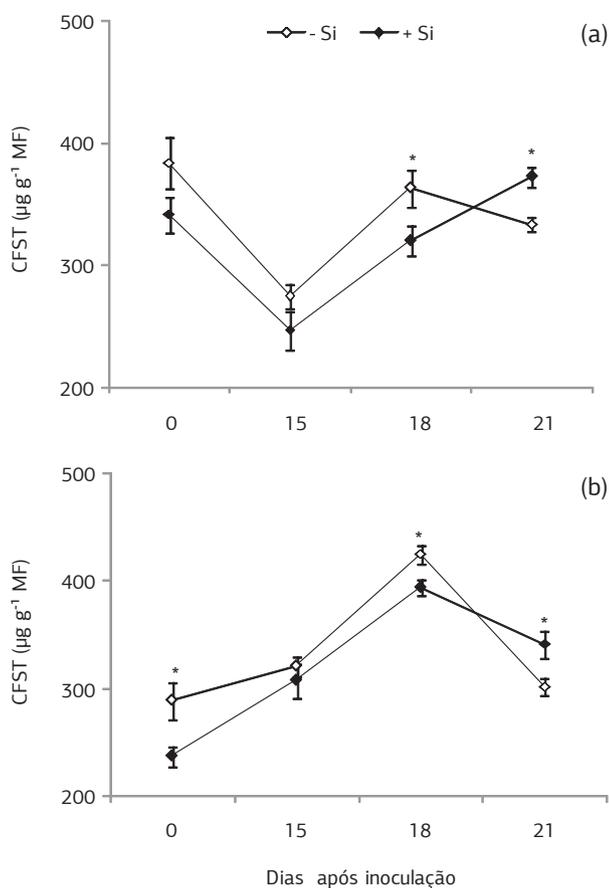


Figura 1. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão 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.

Buriti supridas com Si, houve aumentos significativos de 11 e 12% aos 21 dai respectivamente (Figura 1a,b). Houve diferenças significativas entre as plantas supridas ou não com Si ocorreram para as plantas da cv. BRS Buriti não inoculadas com *R. areola* (Figura 1b).

A concentração de derivados da LATG foi significativamente maior nas plantas da cv. NuOpal supridas com Si e não submetidas à inoculação com *R. areola* com aumento de 31% em relação às plantas não supridas com esse elemento (Figura 2a). As plantas não supridas com Si tiveram aumento significativo de 11% na concentração de derivados da LATG aos 15 dai em comparação com as plantas supridas com Si (Figura 2a). Houve aumento significativo na concentração de derivados da LATG nas plantas da cv. 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 (Figura 2b).

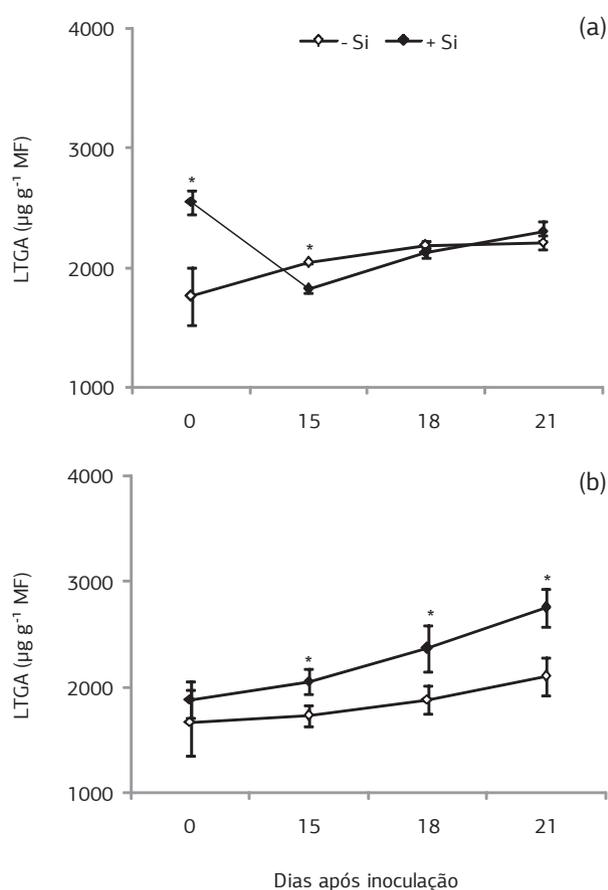


Figura 2. Concentração dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (LTGA) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão 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.

Atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLU e FAL

A atividade da POX aumentou significativamente nas plantas das duas cultivares supridas com Si e submetidas à inoculação com *R. areola* aos 15, 18 e 21 dai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Figura 3a,b). Houve diferenças significativas entre as plantas da cv. NuOpal supridas ou não com Si e não submetidas à inoculação com *R. areola* (Figura 3a).

A atividade da PFO nas plantas da cv. NuOpal supridas com Si e submetidas à inoculação com *R. areola* aumentou significativamente aos 18 dai (Figura 4a). Houve aumento significativo na atividade da PFO nas plantas da cv. BRS Buriti não supridas com Si e inoculadas com *R. areola* aos 21 dai em relação às plantas supridas com Si (Figura 4b). Houve diferença significativa entre as plantas da cv. BRS Buriti supridas ou não com Si e não inoculadas com *R. areola* (Figura 4b).

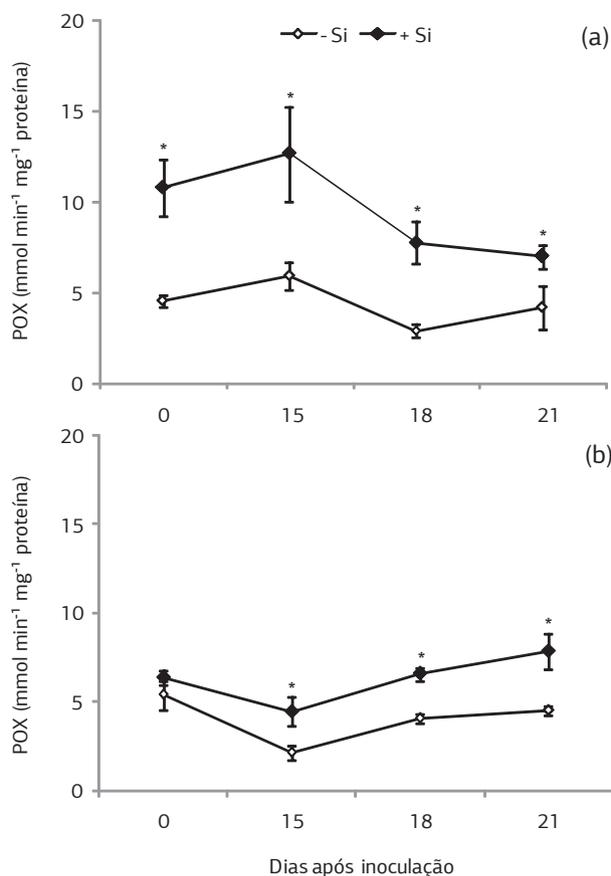


Figura 3. Atividade de peroxidases (POX) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e inoculadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão da média. Médias dos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

Houve aumento significativo na atividade da QUI nas plantas das duas cultivares não supridas com Si aos 15 dai (Figura 5a,b). A atividade da QUI aumentou significativamente nas plantas da cv. NuOpal supridas com Si aos 18 e 21 dai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Figura 5a). Houve diferença significativa entre as plantas da cv. NuOpal supridas ou não com Si e não submetidas à inoculação com *R. areola* (Figura 5a). Houve aumento significativo na atividade da QUI nas plantas da cv. BRS Buriti supridas com Si em comparação com as plantas não supridas com esse elemento aos 21 dai (Figura 5b).

A atividade da GLU e da FAL aumentou significativamente nas plantas da cv. NuOpal supridas com Si aos 18 e 21 dai (Figuras 6a e 7a). Houve diferença significativa entre as plantas da cv. NuOpal supridas ou não com Si e não submetidas à inoculação com *R. areola* (Figuras 6a e 7a). Houve aumento significativo na atividade da GLU nas plantas da cv. BRS Buriti supridas com Si em comparação com as plantas não supridas com Si aos 21 dai

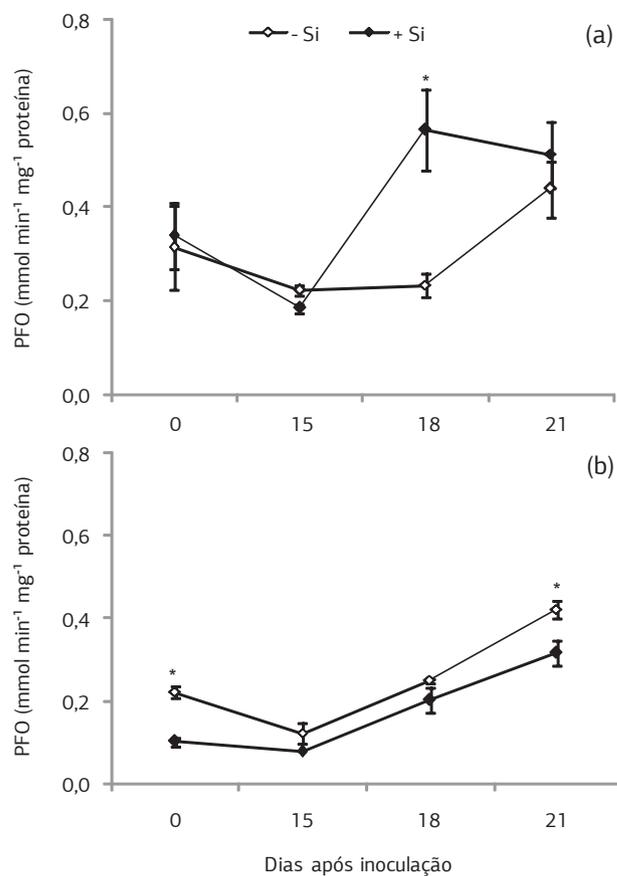


Figura 4. Atividade de polifenoloxidasas (PFO) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão da média. Médias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

(Figura 6b). A atividade da FAL nas plantas da cv. BRS Buriti não supridas com Si e submetidas à inoculação com *R. areola* em relação às plantas supridas com Si aumentou significativamente aos 15 e 18 dai (Figura 7b).

4. DISCUSSÃO

A concentração foliar de Si nas plantas das cvs. NuOpal e BRS Buriti supridas com esse elemento variou de 0,45 a 0,88 dag kg⁻¹ e de 0,51 a 0,57 dag kg⁻¹, respectivamente, o que foi suficiente para reduzir o progresso da mancha de ramulária em algodão. O Si tem reduzido a intensidade de doenças foliares em diversas culturas de importância econômica (DATNOFF et al., 2007).

O PI e o PL₆₀ aumentaram com o fornecimento de Si para as plantas das duas cultivares. Resultados semelhantes também foram observados por RESENDE et al. (2009), cuja aplicação de silicato de cálcio no solo aumentou o PI e o PL da antracnose nas folhas de sorgo,

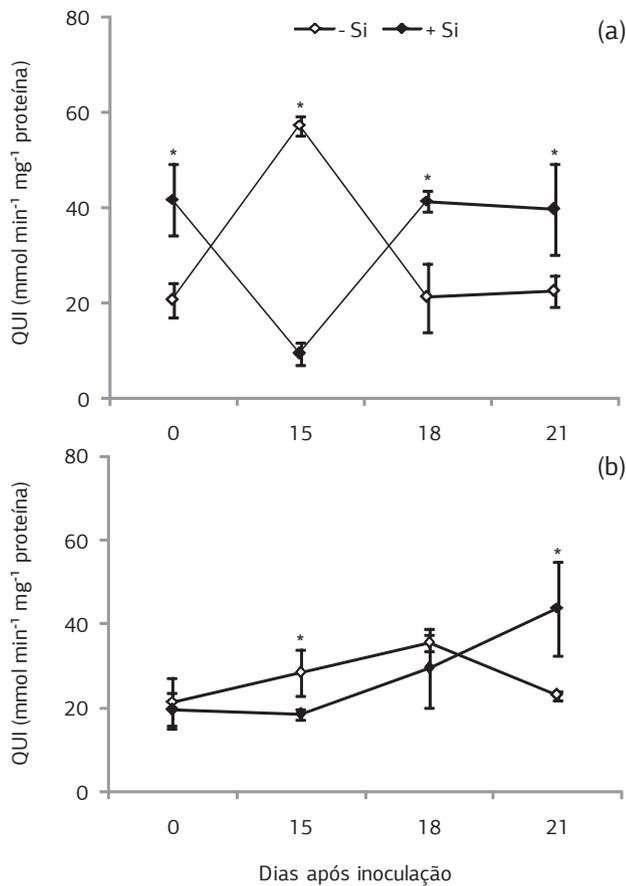


Figura 5. Atividade de quitinasases (QUI) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão da média. Médias dos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

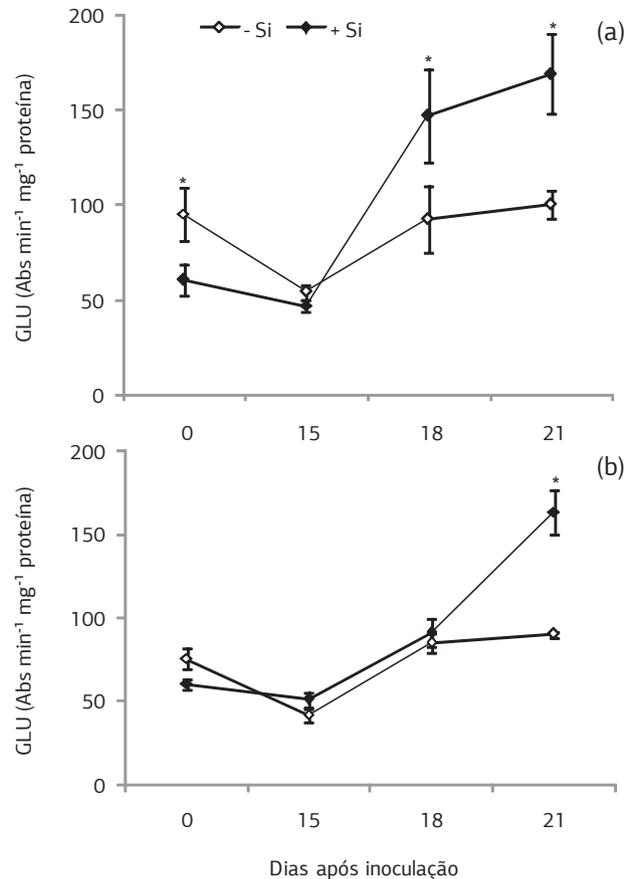


Figura 6. Atividade de β -1,3-glucanases (GLU) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão da média. Médias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

respectivamente, em 13% e 24% em relação às plantas não supridas com esse elemento. Portanto, aumentos significativos no PI resultarão em menor taxa de progresso da doença (r) diminuindo, assim, o número de ciclos secundários dos patógenos foliares (PARLEVLIET, 1979). Nas plantas supridas com Si das duas cultivares houve também redução no NL e no TL. DOMICIANO et al. (2010) relataram que plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana* e supridas com Si tiveram aumento no PI da mancha marrom e reduções na área abaixo da curva do progresso da mancha marrom (AACPM) e no número de lesões por cm² de área foliar.

RODRIGUES et al. (2005) relatam que a aplicação de Si pode aumentar a produção de compostos fenólicos em plantas de arroz infectadas por *Pyricularia grisea*. A concentração de CFST encontrada nesse estudo não está relacionada com a influência do Si em potencializar a resistência das plantas de algodoeiro à mancha de ramularia, pois nas plantas não supridas com esse elemento havia concentrações superiores em relação às plantas supridas

com Si. Resultados similares 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 para plantas de trigo supridas com Si e com redução dos sintomas da brusone e da mancha marrom em relação ao controle.

A concentração de derivados de lignina aumentou após o início da infecção por *R. areola*, estando diretamente associada com o incremento na resistência das plantas da cv. BRS Buriti supridas com Si. No entanto, para as plantas da cv. NuOpal supridas com esse elemento, a concentração dos derivados da LATG não foi influenciada pelo Si. Nesse contexto, o Si poderia estar associado à lignificação da parede celular na cv. BRS Buriti. A lignificação da parede celular estabelece uma barreira mecânica à penetração de patógenos, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas e restringindo a difusão de toxinas (RIDE, 1978).

No que se refere à ativação das respostas bioquímicas das plantas de algodoeiro em defesa à infecção por

R. areola mediante distintas alterações nos níveis enzimáticos, pode-se notar que as enzimas POX, PFO, QUI, GLU e FAL tiveram suas atividades aumentadas quando as plantas da cv. NuOpal foram supridas com Si e infectadas com o patógeno.

As POX estão presentes em diversos compartimentos celulares, catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio e a lignificação de parede celular (KVARATSKHELIA et al., 1997). O aumento das POX tem sido relacionado com mecanismos de resistência para um grande número de interações patógeno-hospedeiro (MOHAMMADI e KAZEMI, 2002). Os resultados desse estudo se assemelham aos observados por DALLAGNOL et al. (2011) que relataram aumento na atividade da POX nas plantas supridas com Si no patossistema arroz-*Bipolaris oryzae*. 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 possuem ação antimicrobiana (LIU et al., 2005). Neste estudo, a atividade da PFO aumentou significativamente somente aos 18 dai, para as plantas infectadas e supridas com Si da cv. NuOpal.

A atividade das enzimas GLU 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 e HWANG, 1994). Elas catalisam a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos como a quitina e o β -1,3-glucano respectivamente. Durante o processo infeccioso, ocorre pronunciado aumento na atividade dessas enzimas o que proporciona uma redução no crescimento e desenvolvimento dos fungos e a liberação de elicitores de mecanismos de resistência (KEEN e YOSHIKAWA, 1983). Os resultados do presente trabalho são similares aos obtidos por DOMICIANO et al. (2010) que demonstraram 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.

A FAL é muito importante no metabolismo secundário das plantas, promovendo a primeira etapa enzimática que converte a *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, sendo o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (RITTER e SCHULZ, 2004). Posteriormente, ocorre a síntese de um grande número de compostos fenólicos e fitoalexinas (RITTER e SCHULZ, 2004). A atividade de FAL foi maior nas plantas submetidas à inoculação e supridas com Si apenas para a cv. NuOpal. Resultados semelhantes ao desse estudo foram obtidos por CHARAKBARTY et al. (2009) que identificaram em plantas da espécie *Gossypium arboreum*, com 5% a 10% da área foliar afetada pela mancha de ramulária, maior atividade da enzima FAL, quando comparados com folhas de plantas saudáveis.

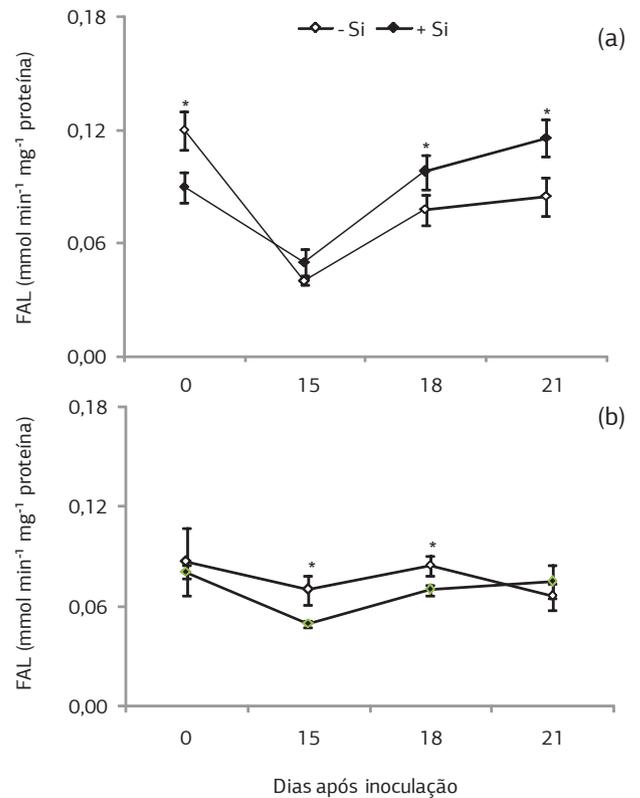


Figura 7. Atividade de fenilalanina amônia-liases (FAL) nas folhas das plantas de algodoeiro das cultivares NuOpal (a) e BRS Buriti (b) cultivadas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si) e infectadas com *Ramularia areola*. Barras em cada ponto representam o desvio-padrão da média.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

Os resultados observados neste estudo permitem concluir que houve aumento da resistência nas plantas de algodoeiro supridas com Si à mancha de ramulária, devido à maior produção de lignina para as plantas da cv. BRS Buriti, aumento na atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLU e FAL para as plantas da cv. NuOpal, e aumento na atividade das enzimas POX, QUI e GLU para as plantas da cv. BRS Buriti em estádios mais avançados da infecção por *R. areola*. Considerando o potencial do Si como uma medida de controle a ser empregada em um programa de manejo integrado para a mancha de ramulária, experimentos de campo são necessários para complementar os resultados em condições controladas, juntamente com outras estratégias de controle que poderão contribuir para reduzir o custo de produção.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo recurso financeiro (Processo APQ-01159-09). Ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado concedida a C.R.S. Curvêlo e pelas bolsas de produtividade em pesquisa dos professores F.A. Rodrigues e P.G. Berger.

REFERÊNCIAS

- 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 ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.361-363, 2008.
- BARBER, M.S.; RIDE, J.P. A quantitative assay for induce lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.32, p.185-197, 1988.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- 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.
- 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.
- DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (Ed.). St. Paul: American Phytopathological Society, 2007. p.233-246.
- 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 of 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.
- HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; LORITO, M.; BROADWAY, R.M.; PIETRO, A.D.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Quitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of quitobiosidase and endoquitinase. *Phytopathology*, v.83, p.313-18, 1993.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular, 347)
- 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: Grupo de Pesquisa em Silício, ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia, 2004. 34p.
- 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*, 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.
- 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. 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.; TAMAI, K.; ICHI, M.; WU, G.F. A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology*, v.130, p.2111-2117, 2002.
- MARUR, C.J.; RUANO, O. A reference system of determination of cotton plant development. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras*, 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 included resistance. *Plant Science*, v.162, p.491-498, 2002.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of 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.
- RIDE, J.P. The role of cell wall interactions in resistance to fungi. *Annals of Applied Biology*, v.89, p.302-306, 1978.

- 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 of Genetic Microbiology*, v.134, p.169-176, 1988.
- 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.
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1. Viçosa Fundação Arthur Bernardes-UFV, 2007.
- 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.
- SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C. Algodoeiro no Cerrado do Brasil. 2.ed. rev. ampl. Aparecida de Goiânia : Mundial Gráfica, 2011. p.567-612.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. Quantificação de doenças - Quant: versão 1.0.1. Viçosa: UFRV, 2001. Software.
- 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.
- YOSHIDA, S. Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science Series*, v.15, p.1-58, 1965.
- 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.