



Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta à inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Fabiana A.C. Silva¹, Roseane C. dos Santos², André de Azevedo Neto³, Manuela M.C. Granja¹, Claudia C. F. de Souza¹ & Pérciles A. Melo Filho¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil; ²Embrapa Algodão, 58107-720, Campina Grande, PB, Brasil; ³Laboratório de Bioquímica CETEC, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil

Autor para correspondência: Fabiana A.C. Silva, e-mail: fabiana.acs@gmail.com

RESUMO

Cinco descritores bioquímicos foram avaliados em algodoeiro infectados com o fungo causador da ramulose visando detectar respostas associadas à infecção. Sementes de quatro cultivares com diferentes níveis de resistência à doença foram semeadas em vasos plásticos, em casa de vegetação. Vinte dias após a emergência, as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^6 conídios/mL de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Folhas foram coletadas aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação e utilizadas para determinação de prolina livre, catalase, peroxidase, carboidratos solúveis e proteínas totais. Verificou-se que os teores de prolina livre, *peroxidase* e *catalase* foram discriminadores na reação de plantas infectadas. Estes descritores apresentaram rápida resposta nos primeiros dias após a infecção das plantas, sendo mais expressivo na cv. resistente BRS Antares. Os descritores prolina livre e *catalase* podem ser utilizados como ferramentas auxiliares na identificação de cultivares resistentes à ramulose nos programas de melhoramento da cultura do algodão.

Palavras-chave: *Gossypium*, enzima, metabólitos, ramulose, resistência.

ABSTRACT

Biochemical descriptors of cotton cultivars in response to *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Five biochemical descriptors were assessed in cotton plants infected with the ramulosis-causing fungus in order to detect differences associated with the infection. Seeds from four cotton cultivars with different levels of resistance were sown in plastic containers in greenhouse conditions. At 20 days after emergence, plants were inoculated with a suspension at 1×10^6 conidia/mL of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Leaves were collected at 3, 15 and 30 days after inoculation and free proline, catalase, peroxidase, soluble carbohydrates and total proteins were determined. Proline, peroxidase and catalase levels discriminated the reaction of infected plants. These descriptors changed soon after infection and the change was more evident in the resistant BRS Antares variety. Free proline and catalase descriptors can be used in the identification of ramulosis-resistant cultivars in cotton breeding programs.

Keywords: Cotton disease, enzyme, metabolites, ramulosis.

Na lavoura algodoeira, o custo com o controle de plantas invasoras, pragas e doenças chega a 30 - 40% do custo total de produção (Freire, 2007). As doenças fúngicas estão entre os principais fatores responsáveis pela queda de produção da cultura. A ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa, é uma das mais prejudiciais, podendo levar a perdas de até 60% na produção (Freire, 2007). O patógeno infecta as folhas, pecíolos e colmo provocando nanismo e superbrotamento dos ramos, o que prejudica a formação

de maçãs e, conseqüentemente, o rendimento do algodão (Mehta et al., 2005).

Muitas plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra perturbações a que são submetidas ao longo do seu ciclo de vida. Algumas delas ativam mecanismos oxidativos buscando eliminar e/ou melhor se adaptar ao agente causador da perturbação, seja ele abiótico ou biótico. Em feijoeiro, Campos et al. (2004), estudando resistência à antracnose em quatro cultivares inoculadas com o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* observaram, após três dias, grande incremento na atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase nas cultivares mais resistentes, correlacionando esta enzima com uma resposta sistêmica da planta à infecção pelo patógeno. Dai et al. (1996) investigaram alterações de compostos bioquímicos em cotilédones de cultivares de

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife PE. 2008.

algodoeiro resistente e suscetível a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* e detectaram altos níveis de flavonóides 10 h após a inoculação, sendo este acúmulo associado a resposta hipersensitiva ao fungo. Nas plantas resistentes houve atividade de peroxidase e terpenóides após 4 h e 48 h da inoculação, respectivamente.

A utilização de descritores bioquímicos como ferramenta auxiliar no entendimento das relações patógeno-hospedeiro tem sido reportada por alguns autores. Scarpari et al. (2005) utilizaram vários descritores bioquímicos para estudar genótipos de *Theobroma cacao* inoculados com *Moniliophthora perniciosa*. Estes autores constataram alterações nos níveis de açúcares solúveis, alcalóides, taninos, clorofilas *a* e *b*, dentre outros, e concluíram que as alterações bioquímicas nos tecidos infectados estão diretamente relacionadas à síntese de etileno pela planta. O objetivo deste estudo foi incrementar o conhecimento relacionado às mudanças bioquímicas que ocorrem no algodoeiro durante a infecção por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e definir descritores que possam ser utilizados como indicadores de resistência à ramulose.

Material biológico e condições experimentais - Sementes das cultivares de algodoeiro BRS Antares (Resistente), BRS Cedro (Moderadamente Resistente), BRS 187 8H (Moderadamente suscetível) e CNPA Precoce I (Suscetível) (Mehta et al., 2005; Zandoná et al., 2006) foram cultivadas em vasos plásticos (5 Kg), contendo solo esterilizado e fertilizado de acordo com as necessidades da cultura. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia (DEPA-UFRPE) nos meses de Julho e Agosto de 2007. Aos 20 dias após a emergência as plântulas foram inoculadas via pulverização com 1 mL de uma suspensão de 1×10^6 conídios/mL de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia do DEPA. A pulverização foi realizada nas folhas do terço médio inferior, constituindo o tratamento inoculado. Para o tratamento controle (plantas não inoculadas com Cgc), as plantas receberam apenas água destilada autoclavada. Após a inoculação, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 72 h e aos três dias após a inoculação (d.a.i.) coletou-se a primeira amostra de folhas de cada cultivar, sem a presença de sintomas característicos da ramulose, para a realização dos testes bioquímicos. As coletas seguintes ocorreram aos 15 e 30 d.a.i., também assintomáticas.

Análises bioquímicas - Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1g de folhas frescas em 10 mL de tampão fosfato (Fosfato monobásico 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7.0). O macerado foi filtrado em tecido, centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 15 min. e o sobrenadante transferido para novos tubos que foram mantidos a -80°C para posterior utilização (Campos et al., 2004). Os ensaios em branco foram realizados utilizando-se apenas tampão fosfato sem a presença dos extratos enzimáticos. Todas as

análises foram realizadas por meio de espectrofotometria (Fenton).

Carboidratos solúveis - Para este composto orgânico empregou-se o método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) com modificações. Para cada amostra de 20 µL do extrato enzimático, foi adicionado 480 µL de tampão fosfato, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado seguindo-se de rápida agitação em vortex. A leitura das amostras foi feita a 490 nm e a curva padrão foi preparada com D-glicose 0,01 % (p/v) e utilizada para comparação com as absorbâncias obtidas. Os resultados foram expressos em µM de carboidratos solúveis /g de matéria fresca.

Proteínas totais - Para esta análise as amostras foram diluídas 20 vezes. Para tanto tomou-se uma alíquota de 20 µL e 480 µL de tampão fosfato seguindo-se de agitação. Em tubos de ensaio de 15 mL depositou-se 100 µL de cada amostra diluída juntamente com 1 mL do Reagente de Bradford (Bradford, 1976). Após 15 min procederam-se as leituras a 595 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão (solução estoque de albumina bovina - 1 mg/mL) e os dados expressos em µM de proteínas totais /g de matéria fresca.

Prolina livre - Adicionou-se 1,0 mL do extrato enzimático em tubos de ensaio de 15 mL, rosqueáveis, contendo 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial concentrado (Bates et al., 1973). Os tubos foram acondicionados em água, a 100 °C, por 1 h. A reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho-maria a 2 °C/30 min. Em seguida, uma alíquota de 2,0 mL de tolueno foi adicionada ao tubo sob agitação por 15 s. A fase aquosa foi recuperada e submetida à leitura a 520 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de prolina (0,0115g de prolina em um volume final de 100 mL com água deionizada) e os resultados expressos em µM de prolina /g de matéria fresca

Catalase - Para análise desta enzima pré-aqueceu-se o tampão fosfato (1,39 mL) por 20 min a 30°C. A seguir, adicionou-se 50 µL do extrato enzimático e 60 µL de peróxido de hidrogênio (500 mM) (Beers & Sizer, 1952). Após agitação em vortex realizaram-se duas leituras a 240 nm, sendo uma aos 15 s e outra a 60 s. Para cálculo desta enzima utilizaram-se as diferenças entre as médias. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto nas condições utilizadas no experimento.

Peroxidase - Nesta análise utilizou-se 1,5 g de folha macerada em nitrogênio líquido. Ao macerado acrescentou-se 4 mL de solução tampão composta por acetato de sódio (0,1 mM/ pH 7,0), ácido acético glacial (0,1 M), EDTA (1 mM) e 1% (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 25 min (4°C) e o

sobrenadante transferido para novos tubos e armazenado a -80°C .

Para a quantificação desta enzima utilizou-se a metodologia descrita em Dann & Deverall (2000). Ao tubo de ensaio adicionou-se 25 μL de guaiacol (0,02 M), 1,0 mL do tampão acetato (100 mM) e 250 μL de peróxido de hidrogênio (0,38 M). Após agitação a mistura foi utilizada como padrão branco para leitura no espectrofotômetro. Em seguida, adicionou-se 25 μL do extrato enzimático e registraram-se os valores da primeira leitura, sendo a segunda efetuada 2 minutos após. A determinação da atividade foi feita medindo-se a variação de absorbância a 470 nm da substância formada na reação enzimática (tetraguaiacol). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto nas condições anteriormente citadas.

Análise dos dados - O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com esquema bi-fatorial (cultivares x tratamentos) e seis repetições. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat 2.0 e as médias foram comparadas pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Reação do algodoeiro à infecção por *C. gloeosporioides* var. *cephalosporioides* - As plantas inoculadas apresentaram

sintomas típicos de ramulose nas folhas, pecíolo e hastes aos 12 dias após a inoculação, sendo menos acentuado nas cvs. Antares e Cedro e mais acentuados na cv. CNPA Precoce I.

As taxas de prolina diferiram entre os tratamentos, apresentando efeito linear ascendente nas cultivares inoculadas, com maior aumento a partir dos 15 dai, atingindo uma média de 69,5 $\mu\text{mol/g}$ aos 30 dai. Isso representa uma diferença de 360% em relação à média do controle. A cultivar resistente BRS Antares apresentou o maior teor de prolina quando inoculada, com média de 40,8 $\mu\text{mol/g}$ aos 15 dias e 104,3 $\mu\text{mol/g}$ aos 30 dias (Tabela 1), sendo superior ao controle em 167 e 567%, respectivamente.

Após reconhecimento do patógeno pela planta, ocorre a síntese de compostos anti-oxidantes que buscam diminuir os danos às células vegetais devido à ação das espécies reativas a oxigênio (ROS) sendo a prolina um desses antioxidantes (Chen & Dickman, 2005). Na literatura, o aumento da prolina tem sido reportado como um processo de defesa das plantas contra o patógeno, cuja análise deste composto é ferramenta acessível para trabalhos de melhoramento, visando detectar plantas resistentes a este fungo. Neste trabalho os registros da concentração de prolina nas plantas foram tomados preliminarmente a partir de 48 h, apenas nas cultivares BRS Antares e CNPA Precoce I. Contudo, nenhuma diferença significativa foi verificada nesta fase (dados não mostrados). A partir dos três dias (72 h) observou-se uma diferença em todas as

TABELA 1 - Valores médios das concentrações de Prolina, Carboidratos solúveis e Proteínas totais em folhas de quatro cultivares de algodão aos 3, 15 e 30 dias após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Cultivar	Prolina ($\mu\text{M.g}^{-1}$ MF)					
	3 dias		15 dias		30 dias	
	C	I	C	I	C	I
CNPA Precoce 1	22,07aA	18,83dB	10,41bB	34,70bA	15,19aB	59,55bA
BRS Antares	19,22bB	28,12aA	15,29aB	40,83aA	15,63aB	104,33aA
BRS 187 8H	18,41bB	25,21bA	10,44bB	30,69cA	15,06aB	66,07bA
BRS Cedro	16,16bB	21,97cA	11,36bB	27,72cA	13,32aB	64,81bA
Cultivar	Carboidratos ($\mu\text{M.g}^{-1}$ MF)					
	3 dias		15 dias		30 dias	
	C	I	C	I	C	I
CNPA Precoce 1	59,27aA	59,79abA	34,77aA	37,44aA	28,26aA	28,73bA
BRS Antares	65,57aA	73,55aA	29,66aB	45,94aA	34,43aA	34,51abA
BRS 187 8H	59,35aA	65,92aA	32,29aA	37,62aA	28,31aA	28,84bA
BRS Cedro	39,26bA	50,17bA	29,55bB	44,80aA	28,11aB	40,21aA
Cultivar	Proteínas totais ($\mu\text{M.g}^{-1}$ MF)					
	3 dias		15 dias		30 dias	
	C	I	C	I	C	I
CNPA Precoce 1	1888,9aA	2341,9aA	1901,7aB	4222,2aA	2863,2bB	5670,9aA
BRS Antares	2497,4aA	2628,2aA	2458,6aB	4098,3aA	4876,1aA	5953,0aA
BRS 187 8H	1778,1aA	3350,4aA	2072,6aB	4910,3aA	2363,2bA	3249,7bA
BRS Cedro	2739,3aA	2891,5aA	2914,8aB	4575,2aA	3512,8bA	3474,4bA

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre cultivares, não diferem significativamente entre si pelo teste SNK ($P < 0,05$). C – controle, I – Inoculado.

cultivares inoculadas, sendo o acúmulo mais expressivo a partir dos 15 dias, quando as médias superaram mais que o dobro as registradas no controle, especialmente na cv. resistente, BRS Antares (Tabela 1). Goicoechea et al. (2000) analisaram a concentração de prolina em folhas de *Capsicum annuum* infectadas com o fungo *Verticillium dahliae*, e verificaram mais do que o triplo de acúmulo de prolina quando as plantas estavam entre 21 e 30 d.a.i. Antes disso, a concentração do aminoácido manteve-se em nível basal, nos dois tratamentos. Isso sugere que, para uso deste descritor como ferramenta discriminatória, a seleção das plantas a partir dos 15 dias após a inoculação é mais confiável e indicada na seleção de plantas resistentes.

Para os teores de carboidratos, as cultivares de algodão apresentaram basicamente a mesma reação com exceção, da BRS Cedro que diferiu em todos os períodos de avaliação quando as plantas foram submetidas à infecção (Tabela 1). Porém, as diferenças não foram grandes o suficiente para que este descritor possa ser sugerido como um caráter na identificação de plantas resistentes ou suscetíveis à ramulose. Isso deve justificar a correlação existente entre o modo de penetração dos fungos na parede celular da planta e a síntese de carboidratos. Os hospedeiros resistentes respondem a esta invasão sintetizando novos carboidratos principalmente celulose e calose. Esta deposição de açúcares solúveis pode se prolongar por um longo período até formar as chamadas papilas. Em indivíduos suscetíveis esta deposição é normalmente escassa ou inexistente (Bell et al., 1981).

Com relação aos teores de proteínas totais (PT) verificou-se aumento na maioria das cultivares inoculadas a partir dos três dias, sendo mais expressivo aos 15 dias. A partir desse período houve diferenças nas cultivares, com aumento nas cvs. BRS Antares e CNPA Precoce 1 e decréscimo nas demais (Tabela 1). Apesar do acréscimo verificado nas médias

da BRS Antares aos 30 dias, nenhuma diferença estatística foi obtida entre os tratamentos. Devido a esses resultados, esse descritor, tal como para carboidratos, não é útil para discriminação de cultivares sensíveis ou resistentes à doença.

Quanto às enzimas oxidativas, observaram-se para peroxidase (POX) duas tendências com relação à sua expressão. Uma representada pelas cvs. BRS Antares e CNPA Precoce I e outra para BRS Cedro e BRS 187 8H. Nas primeiras, a resposta foi observada aos três d.a.i., com produção de 25.907 U/mL e 14.080 U/mL, contra 3.840 U/mL e 2.743 U/mL no controle, respectivamente (Tabela 2). Essa diferença correspondeu a um aumento de 674% nos teores desta enzima na BRS Antares e 573% na CNPA Precoce I. Para as cultivares BSR Cedro e BRS 187 8H, ocorreu o contrário, sendo a maior produção aos 30 dias, quando as plantas inoculadas produziram 13.920 U/mL e 16.333 U/mL, contra 5.762 U/mL e 3.333 U/mL no controle, respectivamente.

Os principais eventos da infecção ocorrem dentro das primeiras 24 h (Honty et al., 2005), mas a detecção das alterações bioquímicas nas plantas por meio das enzimas oxidativas pode ser rápida ou lenta, dependendo do patógeno e da cultura infectada. Honty et al. (2005) estudaram a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em cultivares de pêra sensíveis e resistentes a *Erwinia amylovora*, às 2, 48 e 72 h após a inoculação. Dois dias após a inoculação a quantidade de enzima na cv. resistente aumentou ao longo do desenvolvimento da doença, enquanto que na sensível houve um decréscimo da POX. Campos et al. (2004) verificaram aumento de atividade da POX em plantas de feijão resistentes a *C. lindemuthianum* somente a partir de 3 d.a.i. Em algodão, Dai et al. (1996) verificaram aumento de atividade da peroxidase em plantas resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearu* 4 h após a inoculação. Os altos teores de POX aqui encontrados na cv. BRS Antares atestam

TABELA 2 - Valores médios das concentrações de Peroxidase e Catalase em folhas de quatro cultivares de algodão aos 3, 15 e 30 dias após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Cultivar	Peroxidase (U/mL)					
	3 dias		15 dias		30 dias	
	C	I	C	I	C	I
CNPA Precoce 1	2746,7bB	14080,0bA	1993,3bB	9906,6bA	4226,6aB	9106,6bA
BRS Antares	3840,0bB	25906,7aA	3680,0abB	19026,7aA	3693,3aB	15346,6aA
BRS 187 8H	1780,6bB	10813,3bA	3506,7abB	15880,0aA	3333,3aB	16333,3aA
BRS Cedro	7936,0aB	11626,7bA	6680,0aB	12546,7bA	5762,2aB	13920,0aA
Cultivar	Catalase					
	3 dias		15 dias		30 dias	
	C	I	C	I	C	I
CNPA Precoce 1	3093,3bcB	11586,7cA	2450,0aB	7146,6bA	1386,6aA	1173,3aA
BRS Antares	4638,7abB	22466,7aA	1824,0aA	1706,6cA	1853,3aA	1693,3aA
BRS 187 8H	2093,3cB	9520,0dA	1440,0aA	1360,0cA	1460,0aA	1293,3aA
BRS Cedro	5600,0aB	15426,7bA	1933,3aB	11386,6aA	533,3bA	880,0aA

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre cultivares, não diferem significativamente entre si pelo teste SNK (P<0,05). C – controle, I – Inoculado.

sua condição de resistência à ramulose sendo, portanto, um relevante recurso genético a ser utilizado em trabalhos de melhoramento para transferência de resistência a esta doença.

Quanto à catalase, verificou-se maior produção no início da infecção e queda a partir dos 15 dai (Tabela 2). As cvs. BRS Antares e BRS Cedro apresentaram 4.638 U/mL e 5.600 U/mL nas plantas controle aos 3 dai, respectivamente. Quando infectadas, os níveis foram elevados para 22.467 U/mL e 15.427 U/mL, superando os valores encontrados nas cultivares suscetíveis em ambas as situações. De acordo com Kuzniak & Sklodowska (2005) e Luhová et al. (2006), os teores elevados de catalase servem como indicador da resposta da planta à infecção, sendo frequentemente mais elevado na planta resistente, no início da infecção.

Em trabalhos convencionais de melhoramento de plantas, geralmente, todo procedimento é baseado em descritores fenotípicos, obtidos por meio de inoculação de plantas com o patógeno. A possibilidade de seleção de genótipos resistentes por meio de descritores bioquímicos confiáveis abre perspectivas para auxiliar nos processos de seleção, apresentando ainda a vantagem de redução de custo e de tempo na identificação de acessos resistentes. Apesar de não ter sido encontrada relação direta quanto ao teor de carboidratos e de proteínas na distinção das cultivares resistentes ou suscetíveis de algodoeiro, os resultados obtidos com a prolina e as enzimas peroxidase e catalase foram expressivos e confirmam sua associação com a resposta de defesa da planta ao patógeno.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa Algodão e a Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP pelo apoio financeiro, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.

Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the Breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 195:133-140.

Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 32:21-81.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:246-254.

Campos AD, Ferreira AG, Hampe MMV, Antunes IF, Brancão N, Silveira EP, Osório VA, Augustin E (2004) Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:637-643.

Chen C, Dickman MB (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:3459-3464.

Dai GH, Nicole M, Andary C, Martinez C, Bresson E, Boher B, Daniel JF, Geiger JP (1996) Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:285-306.

Dann EK, Deverall BJ (2000) Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology* 49:324-332.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.

Freire EC (2007) Algodão no Cerrado do Brasil. Cap. 1. Brasília DF. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão ABRAPA. pp. 21-52.

Goicoechea N, Aguirreolea J, Cenoz S, García-Mina JM (2000) *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *European Journal of Plant Pathology* 106:19-25.

Honty K, Hevesi M, Tóth ME, Stefanovits-Bányai E (2005) Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*. *Acta Biologica Szegediensis* 49:127-129.

Kuzniak E, Sklodowska M (2005) Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* 222:192-200.

Luhová L, Lebeda A, Kutrová E, Hedererová D, Peč P (2006) Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biologia Plantarum* 50:675-682.

Mehta YR, Zandoná C, Bibanco K, Almeida WP, Teixeira EA, Cunha HC, Erivaldo J (2005) Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 31:142-145.

Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AWV, Schiavinato MA, Cascardo JCM, Pereira GAG (2005) Biochemical changes during the development of witches broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of Experimental Botany* 56:865-877.

Zandoná C, Novaes TG, Mehta YR, Schuster I, Teixeira EA, Cunha H (2006) Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:76-78.