

FABIANA APARECIDA CAVALCANTE SILVA

**ESTUDO MOLECULAR E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES DE ALGODÃO EM
RESPOSTA A *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa**

RECIFE
FEVEREIRO – 2008

FABIANA APARECIDA CAVALCANTE SILVA

**ESTUDO MOLECULAR E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES DE ALGODÃO EM
RESPOSTA A *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agronomia
(Melhoramento Genético de Plantas)
da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre.**

RECIFE
FEVEREIRO – 2008

**ESTUDO MOLECULAR E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES DE ALGODÃO EM
RESPOSTA A *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa**

FABIANA APARECIDA CAVALCANTE SILVA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho, DEPA, UFRPE.

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, Dep. Biologia, UFRPE

Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, EMBRAPA Algodão- PB.

RECIFE
FEVEREIRO – 2008

**ESTUDO MOLECULAR E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES DE ALGODÃO EM
RESPOSTA A *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa**

Dissertação defendida e aprovada em: 26 de Fevereiro de 2008

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
Professor Associado – Departamento de Agronomia/UFRPE

BANCA EXAMINADORA

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Professora do Departamento de Bioquímica - UFPE

Dra. Lilia Gomes Willadino
Professora do Departamento de Biologia - UFRPE

Dra. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira
Professora do Departamento de Botânica - UFRPE

RECIFE
FEVEREIRO – 2008

O segredo de fazer cada coisa da vida ficar bem feito é o equilíbrio em tudo que fazemos.

*Não devemos ser covardes, nem audaciosos, mas corajosos
Não devemos ser avarentos, nem extravagantes, mas generosos
Não devemos ser geniais nem ignorantes, mas estudiosos.*

Aristóteles (384-322 a.c)

DEDICATÓRIA

À Deus, responsável por todas as coisas, pela sua presença constante trazendo-me paz e confiança para enfrentar os obstáculos....

Aos meus pais, Francisco de Assis e Maria Aparecida pelo carinho, incentivo e dedicação que me permitiram chegar até aqui e continuar...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por possibilitarem a realização deste trabalho e concessão da bolsa.

Aos meus irmãos Francisco Fábio, Fabíola Maria, Fabilson André e Fabiânderon Felipe pelos momentos de descontração e incentivo.

Ao professor Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho pelos ensinamentos, estímulos dados, exemplo de profissionalismo e amizade.

A Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos pelo apoio, amizade e ensinamentos profissionais e pessoais compartilhados ao longo desses quatro anos.

À professora Dra. Maria de Mascena (Mana), chefe do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA, por todo carinho, incentivo e apoio.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas em especial ao professor Dr. Gerson Quirino pelo grande exemplo de profissionalismo, respeito e simplicidade.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas pelo companheirismo e ensinamentos adquiridos com a convivência, em especial Daniel Jordão e Elizabeth Amélia.

A todos do laboratório de Fisiologia Vegetal (UFRPE) na pessoa da professora Dra. Rejane Jurema Mansur, em especial a toda ajuda do Dr. André Azevedo Neto.

Aos professores Dr. Manoel Adrião (Lab. Genética Animal – UFRPE), Dra. Raquel Coimbra (Dep. Pesca – UFRPE), Dra. Vilma Loreto (Lab. Genoma – UFRPE) e Dra. Márcia Vanuza (Lab. Bioquímica – UFPE), Dra. Luiza Bastos (Lab. Genoma – IPA) e respectivos alunos, pelos ensinamentos, colaborações, incentivos e amizade.

Aos amigos Cláudio Melo e Vladimir Silveira pelo carinho, paciência, companheirismo, momentos de descontração e eterna amizade.

A todos os estagiários do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA (Genoma) da UFRPE pela convivência. Em especial aos amigos Karla, Janaina, Isabel e Ebenézer

As amigas Manuela Granja e Elizabeth Amélia, pela grande ajuda para realização do presente trabalho, desde a implantação do experimento na casa de vegetação, todas as dificuldades encontradas, os obstáculos superados e momentos

de descontração.

À Eric e Rinaldo, do laboratório de Pós-colheita, Departamento de Fitopatologia (UFRPE), pelo auxílio e ensinamentos nos experimentos bioquímicos.

À Ivanildo, Léo, Omar e Lucas pelo auxílio nos experimentos na casa de vegetação e no laboratório, e em especial a Seu Ivaldo que, além da ajuda, sempre nos proporcionou momentos de reflexão com sábias palavras e experiência de vida de forma simples e sincera.

À meus amigos de todos os momentos, alegres ou não, Tatiana, Lucas, Diogo, Sergio Rodrigo, Robson, Denise, Vivian, Ingrid, Mariana e Layana.

Aos funcionários da UFRPE Seu Narciso e Joana pela simpatia e prestatividade em todos os momentos.

À todos os amigos que contribuíram, de forma direta e indireta, para a realização deste trabalho pela ajuda, incentivo e compreensão.

MUITO OBRIGADA !!!

SUMÁRIO

	Pág.
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	17
Referências Bibliográficas	30
CAPÍTULO II – Avaliação Bioquímica de Cultivares de Algodão em Resposta a <i>Colletotrichum gossypii</i> South var. <i>cephalosporioides</i> A.S. Costa	36
Resumo	37
Abstract	38
Introdução	39
Material e Métodos	41
Resultados e Discussão	44
Agradecimentos	49
Referências Bibliográficas	50
CAPÍTULO III - Identification of differentially expressed transcripts in cotton varieties infected with <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	63
Abstract	64
Introduction	65
Material and Methods	67
Results	70
Discussion	71
Acknowledgments	74
References	75
CONCLUSÕES GERAIS	86
ANEXOS	88
Normas aos autores: Revista Fitopatologia Brasileira (Capítulo II)	89
Normas aos autores: European Journal Of Plant Pathology (Capítulo III)	101

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Grau de importância das principais doenças que infectam a cultura do algodoeiro no Brasil	19
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Média das cultivares de algodão quanto ao teor de prolina, em três períodos de avaliação, quando submetidas a infecção com o fungo da ramulose	60
Tabela 2. Média das cultivares de algodão quanto ao teor de catalase, em três períodos de avaliação, quando submetidas a infecção com o fungo da ramulose	61
CAPÍTULO III	
Table 1. Differentially expressed transcripts obtained with RAPD primers in cotton cultivars submitted to ramulosis.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de ramulose nas folhas (A e B) e haste (C e D) 21

Figura 2. Resumo esquemático dos processos metabólicos envolvidos no mecanismo de defesa das plantas ao ataque de patógenos 24

CAPÍTULO II

Figura 1. Sintomas de ramulose em cultivares de algodão. Cultivar BRS Antares: (A) Folha, (B) Haste; Cultivar BRS Cedro: (C) Folha, (D) Haste 55

Figura 2. Teores de prolina ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação.* Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade 56

Figura 3. Teores das enzimas oxidativas *peroxidase* (U/mL) (A) e *catalase* (U/mL) (B) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade 57

Figura 4. Teores de carboidratos ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade 58

Figura 5. Teores de proteínas ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

59

CAPÍTULO III

Figure 1. Differentially displayed bands in RT-PCR of total RNA extracted from inoculated and control cotton cultivars using follows primers: OPH 03 (A), OPP 06 (B), OPV 10 (C), OPG 05 (D). AC- BRS Antares-control, AI- BRS Antares-inoculated, PCCNPA Precoce I-control, PI- CNPA Precoce I-inoculated. Marker: Ladder plus 1Kb (Invitrogen).

Arrows: \blacktriangledown down regulation, \blacktriangleup up regulation, \rightarrow actived

82

Figure 2. Differentially displayed bands in RT-PCR of total RNA extracted from inoculated and control cotton cultivars using follows primers: OPE 18 (A), OPL 03 (B), OPA 4 (C), OPW 13 (D). AC- BRS Antares-control, AI- BRS Antares-inoculated, PCCNPA Precoce I-control, PI- CNPA Precoce I-inoculated. Marker: Ladder plus 1Kb (Invitrogen).

Arrows: \blacktriangledown down regulation, \blacktriangleup up regulation, \rightarrow actived

83

Figure 3. Result of BLAST alignment between tV10-200bp and *GmChl 3* gene (AB181949.1) that codifies to *Chlorophyllase III*, in soybean (*Glycine max* L.).

84

Figure 4. Dot-blot analysis in inoculated and control cotton cultivars for identification of a specific transcript related to disease resistance. AC- BRS Antares, control, AI- BRS Antares, inoculated, PC- CNPA Precoce I, control, PI- CNPA Precoce I, inoculated. Dai- days after inoculation.

85

RESUMO

O algodão é uma cultura de grande importância mundial cuja produção é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Dentre os bióticos destacam-se os estresses provocados pelo ataque de insetos e fitopatógenos, cujo controle é bastante difícil devido à variabilidade destes organismos e, conseqüente, a capacidade adaptativa. Entre os fitopatógenos, os fungos são os que causam mais danos ao algodoeiro, destacando-se o *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa, causador da ramulose, doença caracterizada pelo nanismo e super-brotamento dos ramos, que afeta o desenvolvimento das maçãs e o número de capulhos. A principal forma de disseminação é via sementes contaminadas e o modo de controle mais efetivo é por meio de fungicidas químicos ou de cultivares resistentes que são obtidas por meio de exaustivos testes conduzidos em campo e casa de vegetação. A utilização de ferramentas bioquímicas e moleculares que auxiliem na identificação de genótipos resistentes nos programas de melhoramento são de grande relevância uma vez que, além da confiabilidade, reduz os custos de seleção nos processos de desenvolvimento de novas cultivares. No presente trabalho procedeu-se a um estudo bioquímico e molecular em cultivares de algodão submetido à infecção com o fungo da ramulose, visando identificar marcadores associados ao processo de resistência. No primeiro ensaio, avaliaram-se descritores bioquímicos em quatro cultivares de algodão infectado com o fungo causador da ramulose. As plantas foram inoculadas aos 20 dias após o cultivo, recebendo uma concentração fúngica de 1×10^6 conídios/mL. As avaliações ocorreram aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. Observou-se que os teores de prolina, peroxidase e catalase foram bastante expressivos na cultivar resistente BRS Antares apresentando resposta rápida logo aos 3 dias após a inoculação. Os teores de prolina e catalase foram indicados como ferramentas úteis para identificação de cultivares resistentes a ramulose nos trabalhos de seleção na cultura do algodão. No segundo ensaio buscou-se identificar transcritos diferencialmente expressos em plantas de algodão submetidas a infecção com o fungo da ramulose. Duas cultivares antagônicas em relação à resistência a esta doença foram utilizadas, BRS Antares e CNPA Precoce I, respectivamente, resistente e susceptível. Dez oligonucleotídeos RAPD foram utilizados nas reações de RT-PCR a uma temperatura de anelamento de 35 °C. Após análise dos padrões de banda nas plantas controle e inoculada foram

identificados doze transcritos sub-regulados, treze super-regulados e dez ativados. Uma banda de aproximadamente 200 pb obtida com o oligonucleotídeo V10 na cultivar resistente foi seqüenciada e a apresentou homologia de 86 % com o gene *GmChl 3* que codifica para enzima clorofilase III em soja. Esta enzima apresenta grande importância para as células vegetais submetidas a danos oxidativos uma vez que reduz estes estragos além de modular diferentes vias de defesa. Os dados obtidos no presente trabalho são de grande aplicabilidade em estudos de resposta do algodão ao ataque de patógenos além de oferecer informações relevantes para os programas de melhoramento da cultura.

Palavras-chave: Ramulose, doença do algodão, marcadores

ABSTRACT

Cotton is a crop of considerable importance worldwide, the production of which is affected by diverse biotic and abiotic factors. Stress caused by insect attacks and phytopathogens stand out among the biotic factors, the control of which is significantly hindered due the variability of these organisms and their consequent capacity for adaptation. Fungi are the phytopathogens that most cause damage to cotton plants, especially *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa, a ramulosis-causing disease characterized by dwarfism and an over-budding of the branches, affecting the development of the buds and number of bolls. The main form of dissemination is through contaminated seeds and the most effect method of control is by means of chemical fungicides or resistant varieties which are obtained after exhaustive tests conducted in fieldwork and greenhouses. The use of biochemical and molecular tools that assist in the identification of resistant genotypes in improvement programs is of considerable importance, as they offer reliability and reduce selection costs in the development process of new varieties. In the present study, a biochemical/molecular study was carried out on cotton varieties submitted to infection with the ramulosis fungus with the aim of identifying markers associated to the resistance process. In the first assay, biochemical descriptors were assessed in four infected cotton varieties. The plants were inoculated 20 days after cultivation, receiving a fungal concentration of 1×10^6 conidias/mL. Evaluations occurred at 3, 15 and 30 days following inoculation. Proline, peroxidase and catalase levels were quite expressive in the resistant BRS Antares cultivar, exhibiting a rapid response at 3 days after inoculation. Proline and catalase levels are indicated as useful tools for the identification of ramulosis-resistant varieties in cotton crop selection studies. The second assay sought to identify differentially expressed transcripts in cotton plants submitted to infection with the ramulosis fungus. Two varieties with opposing traits regarding resistance to this disease were used: BRS Antares and CNPA Precoce I, respectively resistant and susceptible. Ten RAPD oligonucleotides were used in the RT-PCR reactions at an annealing temperature of 35 °C. Following an analysis of the band patterns in the control and inoculated plants, 12 down-regulated transcripts, 13 overregulated transcripts and ten activated transcripts were identified. A band of approximately 200 bp, obtained with the V10 oligonucleotide, was sequenced and exhibited 86% homology with the *GmChl 3* gene, which codifies for the

chlorophyllase III enzyme in soybean. This enzyme has considerable importance for vegetal cells submitted to oxidative damage, as it reduces this damage and modulates different defense pathways. The data obtained in the present study are applicable to studies on cotton plant responses to pathogen attacks and offers relevant information for crop improvement programs.

Key -words: Ramulosis, cotton disease, markers

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1- Aspectos gerais do algodoeiro

O algodão é uma angiosperma da classe das dicotiledôneas, pertencente à ordem Malvales, família Malvaceae, subtribo Hibisceas, gênero *Gossypium*. Possui elevada importância econômica e social sendo cultivada em mais de 100 países do mundo. Na China e Índia é cultivado em uma área de mais de cinco milhões de hectares onde emprega cerca de 70 pessoas por hectare (BELTRÃO, 2006).

Na literatura são citadas apenas quatro espécies de algodão comerciais dentro do gênero *Gossypium* (*G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L.) o qual compreende 50 espécies (CARVALHO e CHIAVEGATO, 1999). Essas espécies foram domesticadas independentemente, entretanto, o local de origem não é conhecido havendo apenas centros de diversidade: México (18 espécies), África e Arábia (14 espécies) e Austrália (17 espécies) (BRUBAKER et al. 1999). Baseando-se na seqüência de DNA analisada via marcadores ITS das espécies existentes há indícios de que o gênero surgiu cerca de 10 a 20 milhões de anos (SEELANAN et al., 1997).

Dentre as espécies do gênero, 45 são diplóides (26 cromossomos) e cinco tetraplóides (52 cromossomos). Ao todo ocorrem oito genomas sendo sete diplóides (A – B – C – D – E – F – G) e um tetraplóide (K), baseado na similaridade cromossômica (STEWART, 1995). Dentre as autotetraplóides existem apenas duas cultivadas: *G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L., onde esta última apresenta grande interesse comercial em países como Sudão, Peru e Estados Unidos, por possuir fibra longa e de alta qualidade. A espécie *G. hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch, que compreende o algodoeiro herbáceo, também conhecido como anual, apresenta genoma AADD (CIA e FUZZATO, 1999). Dentre as diplóides destacam-se *G. arboreum* e *G. herbaceum*.

A espécie *G. hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch, a mais cultivada mundialmente, apresenta grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes, devido a grande variabilidades de seus acessos (MAUNEY, 1984; OOSTERHUIS, 1999). As flores do algodoeiro são hermafroditas, porém a planta é classificada como parcialmente autógama ou de reprodução mista por possuir taxas de cruzamento natural variável

de acordo com o genótipo e o ambiente, em especial na presença de insetos (FREE, 1993).

Economicamente, o algodão é uma das principais *commodities* nacional. No cenário mundial, essa cultura contribui com cerca de 90% da produção de fibras (CIA e FUZZATO, 1999). No Brasil a produção situa-se em 3.850.952 toneladas colocando-o em posição de destaque na exportação mundial de fibras. Os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Bahia são os maiores produtores com 52% da produção nacional de algodão herbáceo em caroço (IBGE, 2008).

Diversos problemas de ordem fitossanitária têm afetado a cultura do algodoeiro no Brasil. Entre eles destacam-se os provocados pela ação de fungos, vírus, bactérias e nematóides. Na Tabela 1 encontra-se o grau de importância das principais doenças que infectam o algodoeiro. Dentre elas, percebe-se que Ramulose, Mosaico das nervuras, Mancha angular e Manchas foliares são consideradas as mais importantes (CHIAVEGATO, 2001).

Tabela 1. Grau de importância das principais doenças que infectam a cultura do algodoeiro no Brasil

Doenças	Sul/Sudeste			Centro-Oeste			Norte		Nordeste	Total
	PR	SP	MG	GO	MS	MT	RO	PA	Outros	
Murcha do Fusarium	4	5	3	3	2	1	-	-	-	18
Murcha do Verticilium	3	3	1	1	1	1	-	-	X	10
Ramulose	3	3	4	5	4	5	5	5	X	34
Mancha angular	4	3	3	3	3	3	3	3	X	25
Manchas foliares	3	2	2	3	3	4	3	3	X	23
Mosaico das nervuras	4	5	5	5	5	5	X	X	X	29
Viroses	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-
Murchamento avermelhado	4	5	3	3	3	3	-	-	-	21
Nematóides	4	5	4	3	3	2	-	-	-	21
Podridão das maçãs	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-
Mofo branco	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-

Fonte: Chiavegato (2001), modificado de Cia e Fuzatto (1999). Escala de notas: 1= sem importância; 2= pequena importância; 3= Medianamente importante, necessitando de precauções e estudos; 4= importante, demandando medidas de controle; 5= muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle; (X)= presença constatada e (-) sem informações.

2- Ramulose do algodoeiro

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são coleomicetos (anamórficos) e causam grandes danos em lavouras nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo mundo. Este gênero de fitopatógenos compreende cerca de 125 espécies que são responsáveis por uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão, entre outras (BAILEY e JEGER, 1992). Seu ciclo de vida apresenta um estágio sexual, responsável pela variabilidade genética, e um assexual onde ocorre o processo dispersivo do microrganismo (WHARTON e DÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Em continuidade a um evento infeccioso este grupo de fungos necessita diretamente do desenvolvimento de apressórios para realizar a penetração na planta, que ocorre via estomatal (PERFECT et al., 1999).

Em algodão, *C. gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa infecta as folhas, os pecíolos e o colmo provocando nanismo e superbrotamento dos ramos o que prejudica a formação de maçãs e, conseqüentemente, o rendimento do algodão (MEHTA et al., 2005). Em condições ideais esta doença pode causar perdas na produção em até 60 % (FREIRE, 2007).

O início da infecção é caracterizado pela ocorrência de manchas necróticas circulares nas folhas jovens com reentrâncias e de aspecto estrelado, cujo centro normalmente se torna quebradiço quando se localizam no pecíolo e nas nervuras (enrugamento da superfície foliar) (Figura 1). A necrose do meristema apical estimula o desenvolvimento de brotos laterais, para onde é direcionada a produção de assimilados da planta, levando ao superbrotamento e aspecto envassourado, além de pequeno porte e redução do número de capulhos (CIA e SALGADO, 1997).

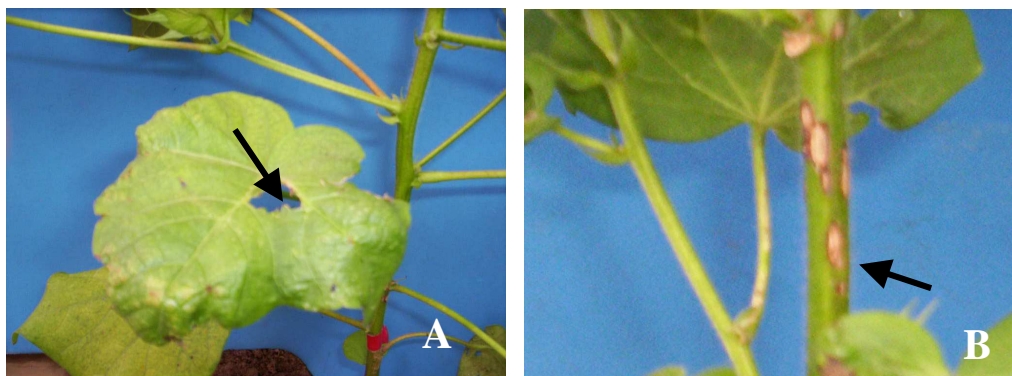


Figura 1. Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de ramulose nas folhas (A) e haste (B).

Disseminação da ramulose

A disseminação do fungo causador da ramulose é diretamente influenciada pelas variações ambientais, em especial a temperatura e a umidade relativa do ar. De acordo com Tanaka (1995) em ambientes com temperaturas elevadas, há uma redução na viabilidade dos esporos, diminuição na formação de lesões, assim como redução na progressão da doença. Entretanto, ainda de acordo com este autor, em ambientes com baixas temperaturas no solo durante o período de germinação, ocorre uma maior incidência de tombamento de plântulas, em pré e pós-emergência.

A ramulose apresenta como principal modo de disseminação as sementes mas, outra via de disseminação é pelo solo contaminado. Por qualquer uma delas, o inóculo primário, encontrando ambiente favorável e hospedeiro suscetível estabelece focos iniciais de infecção. Estes, com o progresso da doença, darão origem a focos secundários que pode levam geralmente a um quadro epidemiológico (TANAKA e MENTEN, 1992; TALAMINI et al., 2004).

2.1. Respostas bioquímicas e moleculares ao estresse

Durante o ciclo de vida, as plantas são continuamente expostas a estresses bióticos e abióticos, desenvolvendo mecanismos de interação com tais eventos. O estresse biótico inclui relações de simbiose, patogenezidade e herbivoria entre diferentes organismos e plantas. Ao longo do tempo, as plantas desenvolveram estratégias naturais de defesa contra os estresses bióticos e estas se baseiam em

dois modos principais: 1 - resistência não-hospedeira e 2 - resistência gene-a-gene (RESENDE, SALGADO e CHAVES, 2003; THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997).

A não-hospedeira é aquela em que todos os indivíduos de uma espécie de planta apresentam resistência a todos os membros de uma determinada espécie de patógeno (raça-específica) (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997). Este tipo de resistência é classificado em dois tipos: Tipo I, caracterizada pela não ocorrência de morte celular e tipo II, onde ocorre resposta hipersensitiva (morte celular programada). A resistência gene-a-gene ocorre devido à presença de um gene de resistência, dominante na planta (gene *R*) e um gene de avirulência dominante no patógeno (gene *Avr*). O mecanismo de interações que ocorre ao longo do evento de estresse biótico é classificado em Incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente) e Compatível (patógeno virulento e hospedeiro susceptível). O evento da resistência das plantas a determinados patógenos está inserido neste contexto. Na incompatível, o mecanismo de defesa é ativado, ocasionando a resistência, enquanto que nas compatíveis não ocorre a ativação ou esta se dá tardiamente (RESENDE, SALGADO e CHAVES, 2003).

Vários eventos se sucedem após reconhecimento de um patógeno como avirulento, desencadeando na planta várias reações bioquímicas de defesa que leva à produção dos chamados intermediários reativos de oxigênio (IRO), conhecidos como 'Reactive Oxygen Intermediates' (ROI) ou 'Reactive Oxygen Species' (ROS), ou ainda 'Espécies Ativas de Oxigênio' (EAO's) (TORRES e DANGL, 2005). Em seguida ocorre a resposta hipersensitiva (RH) com morte celular programada (MCP), e resposta sistêmica adquirida (SAR) (GOZZO, 2003).

Os IROS são produzidos naturalmente no citoplasma e em organelas (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas) como metabólitos secundários formados na fotossíntese e respiração (APEL e HIRT, 2004). Entretanto após o reconhecimento de um patógeno pela planta, são excessivamente produzidas (TORRES e DANGL, 2005). Este processo consiste na retirada seqüencial de elétrons do oxigênio molecular (O_2), onde o primeiro elétron gera o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroperóxil ($\cdot HO_2$); e a remoção do segundo e terceiro elétrons, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), respectivamente (MORI e SCHROEDER, 2004). O fenômeno de produção de H_2O_2 , juntamente com a produção do íon superóxido (O_2^-), é conhecido como "Explosão oxidativa" e foi citada pela primeira vez como uma resposta imediata de defesa da batata infectada com

Phytophthora infestans (DUKE, 1983).

Apesar da importância da explosão oxidativa no processo de defesa das plantas contra patógenos, este processo causa danos nos tecidos vegetais sendo necessário a ação de agente antioxidantes que podem ser agrupados em três classes: 1) lipossolúveis, associados com membranas (ex. a-tocoferol e b-caroteno), 2) hidrossolúveis (ex. glutatona e ascorbato), e 3) com atividade enzimática. Dentre as enzimas envolvidas neste processo destacam-se: *superóxido dismutase* (SOD), *peroxidase* (POX), *ascorbato peroxidase* (APX), *catalase* (CAT), *glutaciona peroxidase* e *glutaciona redutase* (GR). A atividade destas enzimas antioxidantes pode ser intensificada como resposta a fatores de estresse ambiental, como temperaturas extremas (QUEIROZ et al., 1998), déficit hídrico (SCANDALIOS, 1993), altos níveis de ozônio na atmosfera (BLACK et al., 2000), metais pesados (VITÓRIA et al., 2001), bem como a fatores bióticos como ataque de patógenos de modo geral (LAMB e DIXON, 1997).

A chamada Resposta Hipersensitiva pode ser definida como um mecanismo de resistência local caracterizando-se pela morte (MCP- Morte celular programada) de células vizinhas ao local de penetração do patógeno na planta. Este comportamento visa isolar a infecção evitando sua disseminação pelos tecidos vegetais. A RH atua diretamente nos processos fisiológicos da planta de varias formas, por exemplo: um rápido incremento nos teores de agente antioxidantes, perda de íons potássio (K⁺) e ganho de íons hidrogênio (H⁺) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula (fina camada sobre a epiderme do caule e das folhas (VAN DOORN e WOLTERING, 2005).

A SAR (Systemic acquired response) é uma resposta de defesa duradoura mediada pelo acúmulo endógeno de ácido salicílico que induz resistência em locais da planta distantes daquele onde ocorreu a tentativa de infecção, não só contra o patógeno que lhe deu origem, mas mesmo a patógenos não relacionados. Esta resposta está relacionada a superexpressão de vários genes que codificam para proteínas de defesa, as PR-Proteínas (*pathogenesis related* - proteínas relacionadas à patogênese) (DURRANT e DONG, 2004). Dentre elas estão as quitinases, α -1,3-glucanases, proteínas semelhantes à thaumatin, inibidores de proteinases, endoproteinases, peroxidases, proteínas semelhantes à ribonuclease, tioninas ou defensinas, oxalato oxidase, proteínas semelhantes à oxalato-oxidase e outras

proteínas cujas funções biológicas são ainda desconhecidas (VAN LOON e STRIEN, 1999; CHRISTENSEN et al., 2002).

Em continuidade ao processo de defesa das plantas, após reconhecimento do patógeno, ocorre a síntese de barreiras físicas (papilas), aumento da lignificação da parede celular e a síntese de compostos fenólicos secundários de defesa, dentre os quais se destaca as fitoalexinas que são enzimas tóxicas associadas com o metabolismo secundário como exemplo, a fenilalanina amônia-liase (FAL) e a chalcona isomerase (WEN et al., 2005; SOYLU, 2006). Uma síntese desses processos pode ser observada na Figura 2.

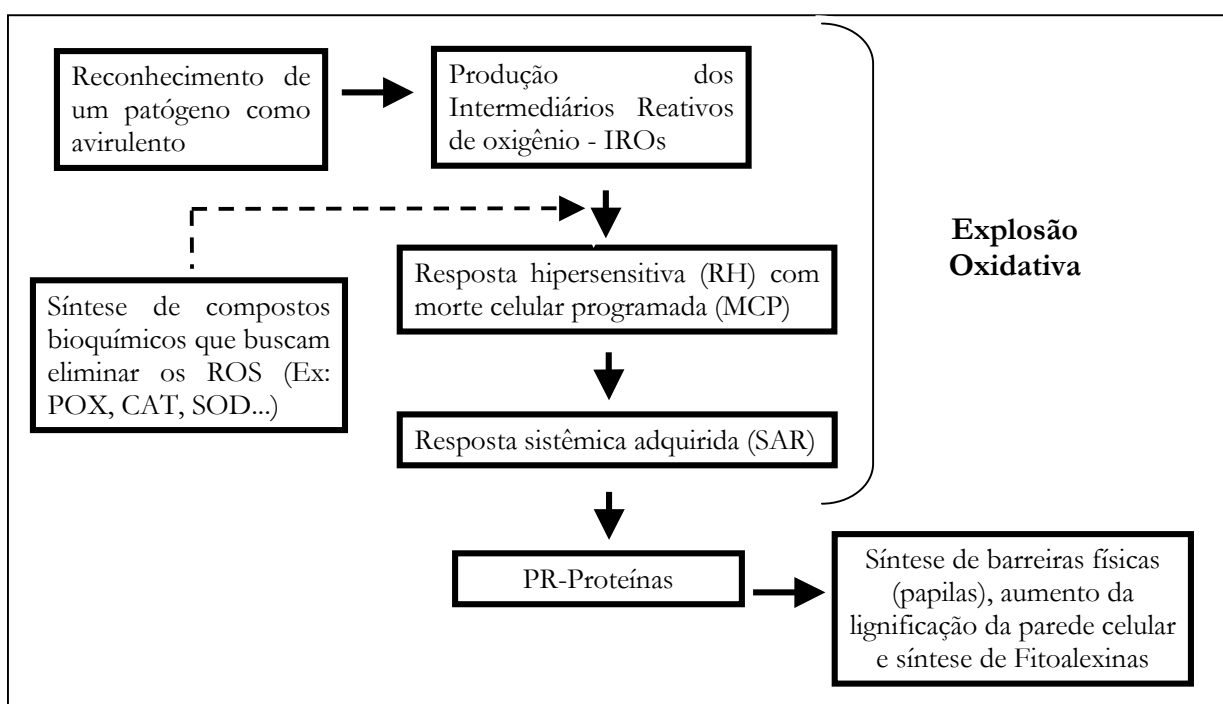


Figura 2. Resumo esquemático dos processos metabólicos envolvidos no mecanismo de defesa das plantas ao ataque de patógenos (TORRES, JONES e DANGL, 2006).

Na literatura, alguns estudos tem sido conduzidos visando investigar o papel de metabolitos primários e secundários nos processos de defesa de plantas ao patógeno. Nojosa et al, (2003) investigaram compostos fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e susceptíveis a *Crinipellis pernicioso*. Os autores observaram que os teores de fenóis solúveis totais aumentaram nos clones resistentes bem como a atividade da *peroxidase*. No clone susceptível ocorreu um aumento da *polifenoloxidase*. Estudo semelhante foi realizado por Ndoumou, Ndzomo e Djocgoue (1996), que investigaram

clones de *Theobroma cacao* com diferentes níveis de susceptibilidade a *Phytophthora megakaraya*. Neste caso os autores constataram que as variações dos compostos bioquímicos, carboidratos, aminoácidos e fenóis, foram genótipo-dependentes

Junqueira, Bedendo e Pascholati (2004) inocularam fitoplasma em plantas de milho resistentes e susceptíveis e verificaram alterações nos níveis nas proteínas, compostos fenólicos, clorofila total e açúcares 10 dias após a inoculação. Exceto quanto aos teores de clorofila que foram reduzidos, os demais compostos aumentaram na cv. susceptível quando comparado a cv. resistente em resposta ao estresse. A redução da clorofila foi explicada como uma interferência do microorganismo no metabolismo deste composto.

Estas barreiras químicas, resultantes do metabolismo secundários dos vegetais, são um dos mecanismos de defesas ao ataque de patógenos e compreendem diversos compostos como glicosídeos cianogênicos e fenólicos, fenóis, alcalóides, fototoxinas e enzimas oxidativas. Alguns autores afirmam que os açúcares presentes nos tecidos de plantas influenciam diretamente na susceptibilidade a doenças retardando ou acelerando o desenvolvimento do patógeno (HORSFALL e DIMOND, 1957). Patil et al., (1985) demonstraram que os açúcares nos tecidos hospedeiros incrementam a severidade da doença (LUKENS, 1970), enquanto que outros autores afirmam que reduzem o desenvolvimento fúngico, podendo ainda ter pouco ou nenhum efeito neste sentido (GIBBS e WILCOXSON, 1972).

A prolina é um outro composto bastante estudado na resposta das plantas a estresses. O acúmulo deste composto em células vegetais tem sido largamente citado como uma resposta a estresse abióticos como seca e salinidade sendo considerada um mecanismo de ajuste osmótico resultante do aumento na via de glutamato ou da ornitina (DELAUNEY e VERMA, 1993). Outros autores sugerem outras funções para o acúmulo de prolina, como: estabilizador de estruturas sub-celulares (SCHOBERT e TSCHESCHE, 1978); seqüestrador de radicais livres (SARADHI et al., 1995); depósito de energia (HARE E CRESS, 1997); componente da cascata de sinalização molecular do estresse (WERNER e FINKELSTEIN, 1995) e constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (NANJO et al., 1999). Alguns estudos envolvendo estresse biótico de plantas têm demonstrado também o papel da prolina nas resposta a infecção (FABRO, et al, 2004; CHEN e

DICKMAN, 2005).

Fabro et al. (2004) submetem plantas de *Arabidopsis thaliana* submetida à infecção com duas raças de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e verificaram elevação nos teores de prolina nos períodos de 12 e 24 h após a inoculação. Este comportamento foi associado a uma resposta hipersensitiva das plantas ao patógeno.

As enzimas oxidativas são também consideradas marcadores bioquímicos característicos de estresse bióticos. As peroxidases (POX) são enzimas presentes em células animais, vegetais e de microorganismos ocorrendo em diversas estruturas celulares como núcleo, membranas e organelas (HOAGLAND, 1990). São consideradas hemoproteínas de oxidoreductase com alta especificidade de acceptora de hidrogênio (ALFENAS et al., 1991). As POX atuam na catálise da oxidação e biossíntese de lignina, gerando H_2O_2 , a partir de NADH, na oxidação de compostos fenólicos e na inibição do crescimento através da oxidação do ácido indol-3-acético (HOAGLAND, 1990).

As catalases (CATs) são oxidoreductases e ocorrem em plantas, animais e microorganismos aeróbios (SCANDALIOS, 1993). De acordo com Frugoli et al., (1996) podem ser encontradas nas mitocôndrias, peroxissomos, glioxissomas e no citoplasma. Assim como as peroxidases, são importantes catalizadores e, como agente regulador dos níveis de H_2O_2 , sua atividade refere-se a converter H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esta classe de enzimas utilizam o peróxido de hidrogênio como agente oxidador de toxinas incluindo compostos fenólicos, álcoois, fomaldeídos e ácido fórmico (RICE-EVANS et al., 1996), removem H_2O_2 dos peroxissomos foliares, devido a oxidação do glicolato na fotorrespiração em plantas C3, e atuam nos glioxissomos e mitocôndrias combatendo H_2O_2 produzidos no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e na cadeia transportadora de elétrons (FRUGOLI et al., 1996; PIMENTEL, 1998). De acordo com Léon et al. (1995) as catalases têm papel fundamental na defesa antioxidante e na transdução de sinais em resposta a estresses ambientais. Estas parecem ser sensíveis à fotoinativação, principalmente em condições de baixa temperatura causando uma drástica inibição da fotossíntese (ELSTNER e OSSWALD, 1994).

Radwan et al., (2007) analisaram folhas de uma cultivar de *Curcubita pepo* infectadas com o vírus do mosaico amarelo (*ZYMV-Zucchini yellow mosaic virus*) e verificaram aumento de atividade de peroxidase em resposta a infecção viral.

Luhová et al., (2006) estudaram a atividade das enzimas catalase, peroxidase, amino-oxidase e fosfatase ácida em duas cvs. de pimenta, resistentes e sensíveis a *Fusarium oxysporum* e *F. solani* ao longo de 28 dias após a inoculação. Verificaram que apenas a fosfatase ácida variou em sua atividade por volta dos oito dias, aumentando nas raízes após infecção e diminuindo nas hastes. Para catalase e peroxidase ocorreu incremento nos teores logo aos 4 dias após a inoculação e uma queda a partir dos 12 dias para CAT e aos 28 dias para POX.

Considerando os aspectos moleculares das interações planta-patógenos sabe-se que em uma reação incompatível os genes responsáveis pela resistência raça-específica (genes R) agem de forma isolada em relação ao genótipo do patógeno (raça fisiológica), de acordo com a teoria gene-a-gene de Flor (1955). Este autor afirma que para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. Desta forma, de acordo com Staskawicz et al., (1995), em decorrência da evolução nestas interações, ocorre uma variabilidade de genes R em indivíduos diferentes de uma mesma espécie hospedeira e uma correspondente variabilidade de genes de avirulência em diferentes raças do patógeno

De acordo com Faleiro et al., (2003), o entendimento desta diversidade de genes R e da disposição destes genes no genoma são de fundamental importância para estudo da evolução gênica e para auxiliar programas de melhoramento de plantas que visem resistência a doenças. Para Yulong et al., (2006), a resistência como um todo é controlada por duas classes de genes: *R*, genes de resistência e *DR*, genes de resposta a defesa. Estudos têm demonstrado que a maior parte dos genes de resistência de plantas até então isolados pertenciam à classe de nucleotídeos (NBS) na região N-terminal que apresenta "motivos conservados" e uma região muito variável com repetições ricas em leucina (LRR) no C-terminal (KOBÉ e DEISENHOFER, 1994). Rossi et al., (1998) mostraram que os genes desta classe conferem resistência a diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides.

Diversos grupos de pesquisa desenvolveram oligonucleotídeos degenerados para regiões NBS buscando amplificar regiões de interesse no genoma das plantas. A partir destes experimentos desenvolveram o grupo de marcadores denominados RGAs (*Resistance Gene Analogs*) que são genes de resistência conhecidos por estarem geneticamente ligados a locos de genes de resistência ou parte dos

mesmos (MADSEN et al., 2003).

Várias respostas moleculares ocorrem em decorrência ao ataque de patógenos como descrito por Takahashi et al., (1990). Este grupo construiu cinco bibliotecas de cana-de-açúcar inoculadas com *Glomus clarum*, sendo quatro de cDNA e uma subtrativa. Os autores identificaram 386 genes, que após sequenciamento, codificaram para produtos com funções diversas como recepção de moléculas sinais, transporte de íons, transdução de sinais e regulação da transcrição.

Em algodão são relatados trabalhos que buscam identificar e caracterizar genes expressos em resposta ao ataque de patógenos. Dowd, Wilson e McFadden (2004) utilizando a técnica de *microarrays* em larga escala analisou as alterações na expressão gênica em tecidos de raízes e hipocótilo de algodão inoculado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Os autores observaram respostas mais expressivas no hipocótilo, com expressão de genes relacionados a patogênese e a biossíntese de gossipol e ligninas.

Um estudo de transcriptoma da interação algodão- *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* foi realizado por Patil et al., (2005) que utilizaram uma biblioteca de cDNA para identificar genes de resistência expresso em folhas inoculadas com esta bactéria. Para realização deste trabalho os autores utilizaram um acesso resistente de algodão que apresentou uma resposta hipersensitiva a infecção. Os resultados obtidos foram bastante promissores uma vez que cerca de 98% dos genes apresentaram comportamento super-regulado em relação ao controle e, destes, 63% apresentaram similaridade com genes associados a defesa de plantas. Genes codificadores de diversas funções foram observadas como síntese protéica, metabolismo secundário, sinalização, morte celular programada, proteínas relacionadas à patogênese ou semelhantes à retrotransposons.

Recentemente vários estudos têm sido desenvolvidos visando elucidar as respostas bioquímicas e moleculares da planta quando submetidas à infecção. Em alguns deles tem sido demonstrado o papel de certos elementos do metabolismo primário e secundário nos processos envolvendo a resistência da planta ao patógeno. Isso é relevante considerando-se a perspectiva de aplicabilidade de tais descritores para auxiliar nos exaustivos trabalhos de seleção de genótipos resistentes nos trabalhos de melhoramento.

O presente trabalho teve por objetivo proceder a um estudo molecular e

bioquímico em cultivares de algodão submetido à infecção com o fungo causador da ramulose visando identificar marcadores envolvidos no processo de resposta da planta à resistência.

3. Referencias bibliográficas

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências vegetais**, Viçosa: UFV, 1991. 243p.

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

BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. *Colletotrichum*: Biologia, patologia e patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 131-133, 1992. 388p

BELTRÃO, N.E.M.; SOUZA, J.G. **Fisiologia e ecofisiologia do algodoeiro**. Algodão: tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Dourados; p. 54-75; 2006.

BLACK, V.J.; BLACK, C.R.; ROBERTS, J.A.; STEWART, C.A. Impact of ozone on the reproductive development of plants. **New Phytologist**, v.147, p.421-447, 2000.

BRUBAKER, C.L.; PATERSON, A.H.; WENDE, J.F. Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. **Genome**, v42, p.184-203, 1999.

CARVALHO, L. H.; CHIAVEGATO, E. J. A cultura do algodão no Brasil: fatores que afetam a produtividade. In: **Cultura do Algodoeiro**. CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTOS, W.J., Ed. Piracicaba: POTAFOS, 1999. p.121-131.

CIA, E.; FUZATTO, M.G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: **Cultura do Algodoeiro**. CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTOS, W.J., Ed. Piracicaba: POTAFOS, 1999. p.121-131.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro. In: **Manual de Fitopatologia**. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (ed.). São Paulo Ceres, 1997. v.2, p. 33-48.

CHIAVEGATO, E.J. Importância potencial de doenças do algodoeiro nas regiões produtoras do Brasil. In: **III CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, Campo Grande, p. 27, 2001.

CHRISTENSEN, A.B.; HO CHO, B.; NAESBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZORDENANA, K.; COLLINGE, D.B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular and Plant Pathology**, v.3, p.135-144, 2002.

DELAUNEY, A.J.; VERNA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmo-regulation in plants. **Plant Journal**, v.4, p.215-223, 1993.

DOWD, C.; WILSON, J.W.; MCFADDEN, H. Gene Expression Profile Changes in Cotton Root and Hypocotyl Tissues in Response to Infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n.6, p.654–667, 2004.

DUKE, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. **Physiology and Plant Pathology**, v. 23, p. 345-347, 1983.

DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p.185-209, 2004

ELSTNER, E.F, OSSWALD, W. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, p.102, 1994.

FABRO, G.; KOVÁCS, I.; PAVET, V.; SZABADOS, L.; ALVAREZ, M.E. Proline Accumulation and AtP5CS2 Gene Activation Are Induced by Plant-Pathogen Incompatible Interactions in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.4, p.343-350, 2004.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.59-66, 2003.

FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, v 45, p.680-685, 1955.

FREE, J.B. **Insect pollination of crops**. New York: Academic Press, 1993.

FREIRE, E.C. (2007). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 918pp.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.). **Plant Physiology**, v.112, p.327-336, 1996.

GIBBS, A.F.; WILCOXSON, R.D. Effects of sugar content of *Poa pratensis* on *Helminthosporium* leaf spot. **Physiology. Plant Pathology**. v.2, p.279–287, 1972.

GOZZO, F. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 4487-4503, 2003

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.

HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. Interactions of tissue sugar, growth substances, and disease susceptibility. **Z Pflanzenkr Pflanzenschutz**, v.27, p.415–421, 1957.

HOAGLAND, R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. **American Chemical Society**, p.87-113, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PESQUISA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm> > Acesso em 07 de fevereiro de 2008

JUNQUEIRA, A.; BEDENDO, I.; PASCHOLATI, S. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, p.181–185, 2004.

KOBE, B.; DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends in Biochemical Sciences**, v.19, p.425-430, 1994.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant **Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.251-275, 1997.

LÉON, J., LAWTON, M.A., RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v.108, n.4, p.1673-1678, 1995.

LUHOVÁ, L.; LEBEDA, A.; KUTROVÁ, E.; HEDEREROVÁ, D.; PEČ, P. Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. Solani*. **Biologia Plantarum**. n.50. v.4: p. 675-682, 2006

LUKENS, R.J., Melting-out of Kentucky Bluegrass, a low sugar disease. **Phytopathology**, v.60, p.1276–1278, 1970.

MADSEN, L.H.; COLLINS, N.C.; RAKWALSKA, M.; BACKES, G.; SANDAL, N.; KRUSELL, L.; JENSEN, J.; WATERMAN, E.H.; JAHOR, A.; AYLIFFE, M.; PRYOR, A.J.; LANGRIDGE, P.; SCHULZE-LEFERT, P.; STOUGAARD, J. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, p.150-161, 2003.

MAUNEY, J. R. Anatomy and morphology of cultivated cottons. In: KOHEL, R. J.; LEWIS, C. F. **Cotton**. Madison, Winconsin: American Society of Agronomy. p.58-80; 1984.

MEHTA, Y.R.; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K.; ALMEIDA, W.P.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H.C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.142-145, 2005.

MORI, I. C.; SCHROEDER, J. I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺-channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant Physiology**, v.135, p.702–708, 2004.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA,

H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, n.18, v.2, p.185-193, 1999.

NDOUMOU, D.O.; NDZOMO, G.T.E.; DJOCGOUE, P.F. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra and Grif. **Annals of Botany**, v.77, p.153–158. 1996.

NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V.; AGUILAR, M.A.G.; BEZERRA, K.M.T.; ANHERT, D.E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, 2003

OOSTERHUIS, H.J.W. Growth and development of cotton plant. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, p. 35-56. 1999.

PATIL, S.H.; HEDGE, R.K.; ANAHOSUR, K.H. Role of sugars and phenols in charcoal rot resistance of sorghum. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.113, p. 30-35. 1985.

PATIL, M.A.; PIERCE, M.L.; PHILLIPS, A.L.; VENTERSAND, B.J.; ESSENBERG, M. Identification of genes up-regulated in bacterial-blight-resistant upland cotton in response to inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.67, n.6, p319-335, 2005.

PERFECT, S.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Rio de Janeiro: EDUR, 1998. 159pp.

QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHÃES, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. **Biologia Plantarum**, v. 41, n.3, p.403-413, 1998.

RADWAN, D.E.M., FAYEZ, K.A. E MAHMOUD, S.Y. HAMAD, A. E LU, G. Physiological and metabolic changes of Cucurbita pepo leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, p.480-489, 2007.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** v.28, p.123-130, 2003.

RICE-EVANS, C.; NICOLAS, J.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medical**, v.20, p.933-956, 1996.

ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.;

WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.95; p.9750-9754, 1998.

SARADHI, P.P; ALIA,; ARORA, S.; PRASAD, K.V.S.K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.209, p.1-5, 1995.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993

SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** , v.541, p.270-277, 1978.

SEELANAN, T., SCHNABEL, A. E WENDEL, J.F. Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). **Systematic Botany** n.22, p.259-290. 1997

SOYLU, S. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v. 170, p. 942–952, 2006.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v.268, p.661-667, 1995.

STEWART, J. MCD (1995) **Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering**, CSIRO, Melbourne. pp. 313-327.

TAKAHASHI, D. **Análise de seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizada por *Glomus clarum***. Piracicaba: ESALQ, 1990. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. *In*: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, p. 45-62, 2004.

TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

TANAKA, M.A.S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. *In*: MENTEN, J.O.M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, 1995. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, pp.171-178.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Relação entre a resistência do algodoeiro à ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, v.18, p.227-234, 1992.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive

response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v.11, p.1187-1194, 1997.

TORRES, M.A.; DANGL, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.397–403, 2005.

TORRES, M.A.; JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, p. 373–378, 2006

VAN DOORN, W. G.e WOLTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **TRENDS in Plant Science**, v.10, p. 117-122, 2005.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, v.57, p.701-710, 2001.

WEN, P-F.; CHEN, J-Y.; KONG, W-FU.; PAN, Q-H.; WAN, S-B.; HUANG, W-D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, v.169, p.928–934, 2005.

WERNER, J.E., FINKELSTEIN, R.R. Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiology Plant Molecular Biology**. n.34, p.13-922. 1995.

WHARTON, P.S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v.61, p.3-22. 2004.

YULONG, G.; WANGZHEN, G.; LEI, W. E TIANZHEN, Z. Isolation and characterization of resistance and defense gene analogs in cotton (*Gossypium barbadense* L.). **Science in China Series C: Life Sciences** v.49, n.6, p.530-542, 2006

Capítulo II

Avaliação bioquímica em cultivares de algodão em resposta a
Colletotrichum gossypii South var. *cephalosporioides* A.S. Costa

A ser submetido na Revista Fitopatologia Brasileira
(ISSN 0100-4158)

Avaliação Bioquímica em Cultivares de Algodão em Resposta a *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa

Fabiana A.C. Silva¹, Roseane C. dos Santos², Péricles A. Melo Filho¹.

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, e-mail: fabiana.acs@gmail.com; pericles@depa.ufrpe.br; ² Embrapa Algodão, CP 174, 58107-720, Campina Grande-PB, e-mail:caval@cpa.embrapa.br

Autor para correspondência: Péricles A. Melo Filho (pericles@depa.ufrpe.br)

SILVA, F.A.C., SANTOS, R.C., MELO-FILHO, P.A. Avaliação Bioquímica de Cultivares de Algodão em Resposta a *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa.

RESUMO

Cinco descritores bioquímicos foram avaliados em plantas de algodão infectadas com o fungo causador da ramulose visando detectar diferenças nos compostos associados à infecção. Foram utilizados quatro genótipos de algodão com diferentes níveis de resistência a doença: BRS Antares (Resistente), BRS Cedro (Medianamente Resistente), BRS 187 8H (Medianamente Susceptível) e CNPA Precoce I (Susceptível). O experimento foi conduzido em casa de vegetação no departamento de Agronomia da UFRPE. As sementes foram semeadas em vasos plásticos e, 20 dias após a emergência, foram inoculadas com uma suspensão de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa na concentração de 1×10^6 conídios/mL. O tratamento controle recebeu água destilada autoclavada. Folhas foram coletadas após 3, 15 e 30 dias após a inoculação e, em seguida, utilizadas nas análises de prolina livre, *catalase*, *peroxidase*, carboidratos solúveis e proteínas totais. Verificou-se que os teores de prolina livre, *peroxidase* e *catalase* foram discriminadores na identificação de plantas infectadas. Estes descritores apresentaram rápida

resposta nos primeiros momentos após a infecção das plantas, sendo mais expressivo na cv. Resistente BRS Antares. A determinação dos teores de prolina livre e *catalase* podem ser utilizadas como ferramentas auxiliares na identificação de cultivares resistentes à ramulose nos programas de melhoramento da cultura do algodão.

Palavras-chave: Doença do algodão, enzima, metabólitos, ramulose.

Biochemical evaluation of cotton varieties in response to *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa

ABSTRACT

Five biochemical descriptors were assessed in cotton plants infected with a ramulosis-causing fungus in order to detect differences in the compounds associated to the infection. Four cotton genotypes with different degrees of resistance to the disease were used: BRS Antares (resistant), BRS Cedro (medianly resistant), BRS 187 8H (medianly susceptible) and CNPA Precoce I (susceptible). The experiment was conducted in a greenhouse in the Agronomy Department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brazil). Seeds were sown in plastic pots and inoculated 20 days after emergence with a *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa suspension at a concentration of 1×10^6 conidia/mL. The control treatment received autoclaved distilled water. Leaves were collected at 3, 15 and 30 days after inoculation and used in the analyses of free proline, catalase, peroxidase, soluble carbohydrates and total proteins. Proline, peroxidase and catalase levels were found to be discriminators in the identification of infected plants. These descriptors exhibited a rapid response soon after infection and were more expressive in the resistant BRS Antares variety. The determination of free proline and catalase levels can be used in the identification of ramulosis-resistant varieties in cotton crop improvement programs.

Keywords: Cotton disease, enzyme, metabolites, ramulosis.

INTRODUÇÃO

O algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hurtch) é uma malvácea originária das Américas que se expandiu para várias regiões do mundo, sendo considerada uma cultura de alto aproveitamento industrial devido à sua fibra, que por ser natural, tem elevado valor de mercado. O Brasil é dos maiores produtores mundiais de algodão, com uma safra superior a 3,5 milhões de toneladas de algodão em caroço (IBGE, 2008).

A lavoura algodoeira é mais concentrada nas regiões dos cerrados do centro-oeste e baiano, onde o manejo é quase que totalmente mecanizado, o que eleva significativamente o custo de produção. No aspecto agrônômico, os principais custos envolvem as despesas para controle de plantas invasoras, pragas e doenças, que chegam a orçar entre 30 e 40% do custo total (Freire, 2007).

As doenças, especialmente as de origem fúngica, estão entre os principais fatores responsáveis pela queda de produção da cultura. A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa, é uma das mais prejudiciais, podendo provocar perdas de até 60% da produção quando encontra condições satisfatórias ao seu desenvolvimento (Freire, 2007). Sua ocorrência está diretamente ligada à associação de fatores ambientais favoráveis, além da utilização de variedades com baixa resistência e, com sementes, muitas vezes, infectadas pelo fungo (Tanaka & Menten, 1992).

Este fungo infecta as folhas, os pecíolos e o colmo provocando nanismo e superbrotamento dos ramos o que prejudica a formação de maçãs e, conseqüentemente, o rendimento do algodão (Mehta et al., 2005) e apresenta como principal modo de disseminação as sementes mas, outra modo é via solo contaminado (Talamini & Stadnik, 2004).

As plantas superiores desenvolveram mecanismos de defesa contra perturbações a quem são submetidas ao longo do seu ciclo de vida. Algumas delas desengatilham mecanismos oxidativos buscando eliminar e/ou melhor se adaptar ao agente causador da perturbação, seja ele abiótico ou biótico. Muitos desses estresses levam à formação de radicais livres, que são altamente prejudiciais

aos sistemas biológicos por causarem oxidação dos tecidos que podem, inclusive, levar a planta à morte (Mahalingam & Fedoroff, 2003).

Agentes antioxidantes, principalmente enzimas, são a forma encontrada por vários vegetais para tentar reverter ou diminuir os estragos causados por estes radicais. Estas enzimas, além de outros agentes como fenóis e compostos derivados, são agrupados entre os chamados metabólitos secundários das plantas e, dependendo do estímulo, podem ser acumulados ou eliminados em resposta ao estresse (Foyer & Noctor, 2005; Soyulu, 2006).

De acordo com Bindschedler et al., (2002) a síntese de alguns compostos pelas plantas infectadas tem importante função na resistência ao organismo invasor. Alguns trabalhos demonstram que estas alterações metabólicas têm importante papel na inibição do estabelecimento ou crescimento dos patógenos (Dai et al., 1996; Campos et al 2004; Omokolo et al 2002). Dai et al. (1996) investigaram alterações de compostos bioquímicos em cotilédones de duas cultivares de algodão resistente e susceptível a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, e detectaram altos níveis de flavonóides 10 h após a inoculação, sendo este acúmulo associado a uma resposta hipersensitiva do cotilédone do algodão ao fungo. Nas plantas resistentes houve atividade de *peroxidase* e terpenóides após 4 h e 48 h da inoculação, respectivamente.

Campos et al (2004), estudando resistência à antracnose em quatro cultivares de feijoeiro inoculadas com o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* observaram, após três dias, um grande incremento na atividade das enzimas *polifenoloxidase* e *peroxidase* nas cultivares mais resistentes correlacionando esta enzima com uma resposta sistêmica da planta ao ataque do patógeno. Omokolo et al (2002) estudando a resposta de nove clones de *Theobroma cacao* L. à infecção por *Phytophthora megakarya* constatou uma relação negativa entre o desenvolvimento das lesões e os teores de aminoácidos e carboidratos no córtex vegetal considerando este resultado como genótipo-dependentes, ou seja, entre clones foi possível observar um acúmulo variável destes compostos. Scarpari et al., (2005) analisou o comportamento de diversos compostos bioquímicos em *Theobroma cacao* L. inoculada com *Crinipellis pernicioso* desde a implantação do patógeno até o desenvolvimento da doença. 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.

Com o objetivo de analisar a atividade de alguns metabólitos primários e secundários em plantas de algodão infectadas com o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, realizou-se o presente trabalho.

MATERIAL DE MÉTODOS

Material biológico e condições experimentais

Utilizou-se quatro cultivares de algodão desenvolvidas pela Embrapa Algodão com diferentes níveis de resistência a ramulose. São elas: BRS Antares (Resistente) (Metha et al, 2005; Zandoná et al, 2006), BRS Cedro (Medianamente Resistente), BRS 187 8H (Medianamente Susceptível) e CNPA Precoce I (Susceptível) (Freire, Morello & Farias, 2007; Suassuna & Coutinho, 2007; Zandoná et al, 2006). O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) nos meses de Julho e Agosto de 2007.

As sementes foram deslintadas e cultivadas em vasos plásticos de 5 Kg (50 cm de diâmetro) contendo solo esterilizado e fertilizado de acordo com as necessidades da cultura. Aos 20 dias após a emergência as plântulas foram inoculadas com aspersor manual com uma solução de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, cedido pela micoteca do Departamento de Agronomia da UFRPE, na concentração de 1×10^6 conídios/mL em água destilada. Os tratamentos constaram de controle, onde as plantas receberam apenas água destilada autoclavada, e infectado, onde as plantas receberam 1 mL da suspensão fúngica nas folhas do terço inferior. Após a inoculação, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 72 h e, a seguir, realizou-se a primeira coleta de folhas para os testes bioquímicos. As coletas seguintes foram feitas aos 15 e 30 dias após a inoculação (dai). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições.

Análises bioquímicas

Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1g de folhas frescas em 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 e conservados 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, utilizando-se espectrofotômetro marca Fenton.

Carboidratos solúveis.

Para este composto orgânico empregou-se o método Fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) com modificações. Resumidamente, para cada amostra de 20 µL do extrato enzimático, adicionou-se 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 µmol de carboidratos solúveis /g de matéria fresca.

Proteínas totais

Para esta análise as amostras foram diluídas 20X. 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 µmol de proteínas totais /g de matéria fresca.

Prolina livre

Para análise deste iminoácido 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, 1973). Os tubos foram acondicionados em banho-maria, a 100 °C, por 1 h. A reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho-maria a 2 °C. Em seguida, uma alíquota de 2,0 mL de tolueno foi adicionada ao tubo sob agitação por 15 seg. A fase aquosa superior (cromóforo + tolueno) 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 μmol de prolina /g de matéria fresca.

Catalase

Para análise desta enzima pré-aqueceu-se previamente o tampão fosfato (1,39 mL) por 20 min a 30 °C. A seguir, adicionou-se 50 μL do extrato e 60 μL de peróxido de hidrogênio (500 mM) (Beers, 1952). Após agitação em vortex realizaram-se duas leituras a 240 nm, sendo uma aos 15 seg e outra aos 1 min e 15 seg. Para cálculo desta enzima utilizou-se a diferença 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 e 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. Adicionou-se então 25 µL do extrato enzimático e registrou-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 citadas anteriormente.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística utilizando-se o programa SAEG 9.1 (Sistema para análises estatísticas, 2007) utilizando o teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. As figuras foram geradas no programa de Excel baseando-se nas médias dos tratamentos em função dos períodos avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas inoculadas apresentaram sintomas cerca de 12 dias após a inoculação com o patógeno. Fenotípicamente, todas as cultivares apresentaram sintomas típicos de ramulose nas folhas e hastes, sendo menos acentuado nas cvs. Antares e Cedro (Figura 1) e mais expressivo na cv. CNPA Precoce I.

Uma síntese do comportamento bioquímico das cultivares sadias e inoculadas encontram-se nas Figuras 2 a 6. Observa-se que as taxas de prolina diferiram estatisticamente entre os tratamentos, apresentando efeito linear ascendente nas cultivares inoculadas, com maior expressividade a partir dos 15 dias após a inoculação, atingindo uma média de 69,53 µmol/g aos 30 dai, o que representa uma diferença de 360% em relação à média do controle (Tabela 1). A cultivar resistente BRS Antares apresentou o maior teor de prolina, quando submetida ao fungo, com média de 40,83 µmol/g aos 15 dias e 104,32 µmol/g aos 30 dias (Figura 2), sendo superior ao controle em 167 e 567%, respectivamente.

Chen & Dickman (2005) reportaram que, após reconhecimento do patógeno pela planta ocorre síntese de compostos anti-oxidantes que buscam diminuir os danos as células vegetais devido a ação das Espécies Reativas a Oxigênio (ROS) sendo a prolina um desses antioxidantes. O aumento da prolina observado na cv. BRS Antares pode ser justificado como um processo de defesa das plantas contra o patógeno. Esse resultado é relevante porque torna a análise deste composto uma ferramenta acessível para ser utilizada nos trabalhos de melhoramento, visando detectar plantas resistentes a este fungo. Fabro et al. (2004) observaram resultados semelhantes em *Arabidopsis thaliana* quando submeteram a planta à infecção por duas raças da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Estes autores observaram um acúmulo de prolina entre 12 e 24 h nas plantas inoculadas e reportaram que a biossíntese deste iminoácido parece estar envolvida em uma resposta hipersensitiva a estresse biótico.

O comportamento das cultivares quanto as enzimas oxidativas é apresentado nas Figuras 3 e 4. Para a *peroxidase* (POX), observa-se duas tendências com relação a sua expressão, uma representada pelas cvs. BRS Antares e CNPA Precoce I e outra para BRS Cedro e BRS 187 8H. Nas cvs. BRS Antares e CNPA Precoce I, a resposta da enzima foi observada logo aos 3 dias após a inoculação, com produção de 25.907 U/mL e 14.080 U/mL, quando inoculadas, contra 3.840 U/mL e 2.743 U/mL no controle, respectivamente (Figura 3). Essa diferença corresponde a uma elevação de 674 nos teores desta enzima na BRS Antares e 573% na CNPA Precoce I. Para as cultivares BSR Cedro e BRS 187 8H, o comportamento foi contrário, sendo de 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 nas controle, respectivamente.

De acordo com alguns autores, os principais eventos da infecção ocorre dentro das primeiras 24 horas (Shimoni et al, 1991; Nawar e Kuti, 2003; Honty et al, 2005). A explosão oxidativa tem início cerca de 3 horas após a infecção sendo caracterizada pela produção de espécies reativas a oxigênio (ROS), principalmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Martinez et al. 2000). Honty et al. (2005) estudaram a atividade das enzimas *peroxidase* e polifenoloxidase em cultivares de pêra sensíveis e resistentes a ação da bactéria *Erwinia amylovora*, às 2, 48 e 72 horas após a inoculação.

Segundo esses autores as cultivares sensíveis e resistentes apresentaram aumento na atividade de ambas as enzimas no segundo e terceiro dias após a inoculação, respectivamente. Na cv. resistente este aumento continuou ao longo do desenvolvimento da doença, enquanto que na sensível houve um decréscimo da POX. Os mesmos autores sugerem ainda que quanto maior o incremento de POX mais efetivos são os mecanismos envolvidos no processo de defesa. Desta forma os altos teores aqui encontrados na cv. BRS Antares atesta sua condição de resistente à ramulose sendo, portanto, um relevante recurso genético a ser utilizado em trabalhos de melhoramento para transferência de resistência a esta doença.

Há casos, contudo, em que plantas sensíveis ou tolerantes a doença apresentam um sistema patógeno-hospedeiro incompatível. Neste caso, o mecanismo de defesa é desencadeado tardiamente, podendo ainda não ocorrer, ocasionando a doença. (Resende, Salgado e Chaves, 2003). Isso pode ser o caso das cvs. BRS Cedro e BRS 187 8H que apresentaram uma resposta tardia, cuja maior produção de *peroxidase*, em relação ao controle, ocorreu aos 30 dias.

Vários autores têm demonstrado que a atividade da *peroxidase* está associada com a resistência à doença em várias culturas. Shimoni et al (1991) estudando cultivares de milho resistentes e susceptíveis a *Exserohilum turcicum* observou uma rápida produção de *peroxidase* nas cultivares resistentes. Nas cvs. sensíveis houve uma resposta tardia evidenciada com o rápido aparecimento da doença. Em fava, Nawar e Kuti (2003) observaram que após infecção com o fungo *Botrytis fabae*, os níveis de *peroxidase* variaram entre as cultivares havendo grande incremento na resistente e pouca diferença na susceptível em relação ao controle. Assim, os autores sugeriram esta enzima POX como um descritor para seleção de variedades resistentes a *Botrytis fabae*.

Com relação à *catalase* verificou-se que o comportamento foi similar para todas as cultivares que apresentaram maior produção no início da infecção e forte queda a partir dos 15 dias (Tabela 2). As cvs. BRS Antares e BRS Cedro apresentaram cerca de 4638 U/mL e 5600 U/mL nas plantas controle aos 3 dias (Figura 3). Quando infectadas, os níveis foram elevados para 22.467 U/mL e 15.427 U/mL, correspondendo a um aumento de 384 % e 175 %, respectivamente. Nas cultivares sensíveis essa variação foi de 374% para CNPA Precoce I e 454 % para CNPA 187 8H. Apesar

destes valores em termos relativos, os teores da enzima nas cultivares sensíveis foi menor. Esses resultados corroboram com o que tem sido encontrado na literatura.

Em estudo realizado com dois genótipos de pimenta com diferentes níveis de resistência a dois patógenos, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, Luhová et al (2006) analisaram a atividade de enzimas oxidativas *catalase* e *peroxidase* e verificaram que a maior atividade ocorreu aos 4 dias caindo por volta dos 12 dias após a infecção para CAT e aos 28 dias para POX. Quanto as demais apenas houve variação em relação a fosfatase ácida que decresceu nas raízes e aumentou nas hastes após a infecção.

A *catalase*, em plantas, é uma importante enzima envolvida nos mecanismos de defesa antioxidante em resposta as estresses fisiológicos e ambientais (Scandalios,1969). Juntamente com a Superóxido dismutase, a *catalase* atua na detoxificação das células sob estresse oxidativo, ou seja, busca reduzir os danos causados pela produção de ROS. A detoxificação é considerada como uma importante linha de defesa das plantas exigindo uma ação rápida e eficaz, garantindo assim uma maior sobrevivência das células sob estresse principalmente nas mitocôndrias vegetais (Moller, 2001). Para vários autores, os teores elevados desta enzima serve como indicador da resposta da planta à infecção, sendo frequentemente mais elevado na planta resistente (Kuzniak & Sklodowska, 2005; Luhová et al 2006).

Com relação aos teores de carboidratos (CHON) e proteínas (PT) verificou-se que, para o primeiro, as cultivares de algodão apresentaram, basicamente, o mesmo comportamento com exceção da BRS Cedro que diferiu em todos os períodos de avaliação nas plantas submetidas a infecção (Figura 4). No geral, contudo, a media obtida nas cultivares foi de 63.9 $\mu\text{mol/g}$ MF aos 3 dias de avaliação, 36.19 $\mu\text{mol/g}$ aos 15 dias e 30.5 $\mu\text{mol/g}$ aos 30 dias. Na cultivar BRS Cedro, esses valores foram de 39.25 $\mu\text{mol/g}$, 19.55 $\mu\text{mol/g}$ e 28.1 $\mu\text{mol/g}$ aos 3, 15 e 30 dias nas plantas controle e 50.17 $\mu\text{mol/g}$, 44.8 $\mu\text{mol/g}$ e 40,21 $\mu\text{mol/g}$ nas infectadas. Com base nestes resultados, verifica-se, para as condições estudadas, a análise de carboidratos não parece ser um bom descritor para detecção de plantas resistências.

Em outros trabalhos encontrados na literatura, contudo há relatos de que a síntese de carboidratos está diretamente associada ao mecanismo de defesa das plantas. De acordo com Horsfall & Dimond (1957), a elevação nos níveis de carboidratos solúveis (“*High sugar resistance*”) parece estar envolvida numa alteração do metabolismo primário visando uma defesa contra patógenos. A síntese de açúcares, em plantas, está diretamente relacionada à regulação da expressão gênica, e sua presença tende a reduzir a necessidade de fotossíntese, ou seja, reduz a síntese de pigmentos (Ludewig et al., 1998). Este comportamento tem sido considerado uma resposta das plantas a infecção. Uma importante correlação existe 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 prolongada por um longo período até formas as chamadas papilas. Em indivíduos susceptíveis esta deposição é normalmente escassa ou inexistente (Bell et al, 1981).

Com relação aos teores de proteínas totais verificou-se aumento em todas as cultivares até os 15 dias após a inoculação do fungo. A partir desse período houve um comportamento diferenciado nas cultivares ocorrendo um aumento contínuo nas cvs. BRS Antares e CNPA Precoce 1 e um decréscimo nas demais (Figura 5). Devido a esse comportamento diferenciado, e considerando-se o perfil detectado na cv. resistente BRS Antares, com baixa expressividade nos teores produzidos nos tratamentos controle e infectado, esses descritores, tal como visto nos carboidratos, foi pouco responsivo na diferenciação de cultivares sensíveis ou resistentes à doença.

Embora se saiba que a geração de espécies reativas a oxigênio induzem modificação covalente nas proteínas levando a chamada Oxidação protéica, que tem sido considerada com importante marcador bioquímico do estresse oxidativo (Moller *et al.*, 2007), em plantas os efeitos desta oxidação têm sido pouco estudados havendo apenas grandes esforços da explicação desses fenômenos ocorridos em mitocôndrias.

Apesar de não ter sido encontrada relação direta quanto aos teores de carboidratos e de proteínas totais na distinção das cultivares resistentes ou susceptíveis de algodão, os resultados

obtidos com a prolina e as enzimas *peroxidase* e *catalase* foram significativamente expressivos e confirmam sua associação com a resposta de defesa da planta ao patógeno.

Em trabalhos convencionais de melhoramento de plantas geralmente todo procedimento é baseado em descritores fenotípicos, obtidos por meio de submissão de plantas ao patógeno, onde são analisadas várias plantas simultaneamente em condições naturais ou em casa de vegetação. A possibilidade de seleção de genótipos resistentes por meio destes 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.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, a Embrapa Algodão pelo apoio financeiro, a CAPES pela concessão da bolsa e ao Dr. André de Azevedo Neto, do laboratório de Fisiologia Vegetal, pela colaboração nos procedimentos experimentais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATES, L.S., WALDREN, R.P. & TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil** 39:205-207. 1973.

BEERS., R.F. & SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the Breakdown of hydrogen peroxide by *catalase*. **The Journal of Biological Chemistry** 195:133-140. 1952.

BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology** 32:21-81. 1981.

BINDSCHEDLER, L.F., BLEE, K.A., BUTT, V.S., DAVIES, D.R., GARDNER, S.L., GERRISH, C. & MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany** 53:1357-1376. 2002.

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** 72:246-254, 1976.

CAMPOS, ÂD., FERREIRA, A.G., HAMPE, M.M.V., ANTUNES, I.F., BRANCÃO, N., SILVEIRA, E.P., OSÓRIO, V.A. & AUGUSTIN, E. Atividade de *peroxidase* e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira** 39:7:637-643, 2004.

CHEN, C. & DICKMAN, M.B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:3459–3464, 2005.

DAI, G.H., NICOLE, M., ANDARY, C., MARTINEZ, C., BRESSON, E., BOHER, B., DANIEL, J.F. & GEIGER, J.P. 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. 1996.

DANN, E.K. & DEVERALL, B.J. 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.

2000

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28:350-356, 1956.

FABRO, G., KOVACS, I., PAVET, V., SZABADOS, L. & ALVAREZ, M.E. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plantpathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Microbe Interactions** 17:343–350. 2004.

FOYER, C.H. & NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell** 17:1866 -1875. 2005.

FREIRE, E.C. (2007). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 918pp.

FREIRE, E.C., MORELLO, C.L. & FARIAS, F.J.C. Melhoramento do algodoeiro no Cerrado. In: Freire, E.C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 2007. p. 479-521.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PESQUISA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 07 de Fevereiro de 2008.

HONTY, K, HEVESI, M., TÓTH, M. E STEFANOVITS-BÁNYAI, E. Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*. **Acta Biologica Szegediensis** 49:127-129, 2005

HORSFALL, J. & DIMOND, A. Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. **Zeitschrift für PflanzenkrPflanzenschutz** 64: 415–421. 1957.

KUŹNIAK, E & SKLODOWSKA, M. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta** 222:1:192-200. 2005.

LUDEWIG, F., SONNEWALD, U., KAUDER, F., HEINEKE, D., GEIGER, M., STITT, M., MULLER, R., GILLISSEN, B., KUHN, C. & FROMMER, W.B. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. **FEBS Letter** 429:147-151. 1998.

LUHOVÁ, L., LEBEDA, A. , KUTROVÁ, E., HEDEREROVÁ, D. & PEČ, P. *Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in Pisum sativum during infection with Fusarium oxysporum and F. Solani.* **Biologia Plantarum** 50::4:675-682, 2006

MAHALINGAM, R. & FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum** 119:56–68. 2003

MARTINEZ, C., BACCOU, J-C, BRESSON, E., BAISSAC, Y., DANIEL, J-F., JALLOUL, A., MONTILLET, J-L., GEIGER, J.P., ASSIGBETSE, K. & NICOLE, M. Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology** 122:757–766, 2000

MEHTA, Y.R., ZANDONÁ, C., BIBANCO, K., ALMEIDA, W.P., TEIXEIRA, E. A., CUNHA, H.C. & ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica** 31:142-145. 2005.

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

MOLLER, I.M., JENSEN, P.E. & HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology** 58:459-481. 2007.

NAWAR, H.F., KUTI, J.O. & WYERONE,. Acid Phytoalexin Synthesis and *Peroxidase* Activity as Markers for Resistance of Broad Beans to Chocolate Spot Disease. **Journal of the Phytopathology** 151:564–570. 2003.

OMOKOLO, N.D., NANKEU, D.J., NIEMENAK, N & DJOCGOUE, P.F. Analysis of amino acids and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. **Crop Protection** 21:395–402. 2002.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28:123-130. 2003.

SAEG – Sistema para análise estatística, Versão 9.1; Fundação Arthur Bernardes – UFV – Visoça – 2007.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Review of Biochemical Genetic** 3:32-39, 1969.

SCARPARI, L.M., MEINHARDT, L.W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A.W.V., SCHIAVINATO, M.A., CASCARDO, J.C.M & PEREIRA1, G.A.G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany** 56 (413): 865–877. 2005.

SHIMONI, M., BAR-ZUR, A & REUVENI R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopathology** 131:315-321, 1991.

SOYLU, S. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, 170:942–952, 2006.

SUASSUNA, N.D. E COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire, E.C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 2007. p. 479-521.

TALAMINI, V. & STADNIK, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, p. 45-62, 2004.

TANAKA, M.A.S. & MENTEN, J.O.M. Relação entre a resistência do algodoeiro à ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica** 18:227-234. 1992.

ZANDONÁ, C., NOVAES, T.G., MEHTA, Y.R., SCHUSTER, I., TEIXEIRA, E.A. & CUNHA, H. Herança de resistência à *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira** 31:76-78. 2006.

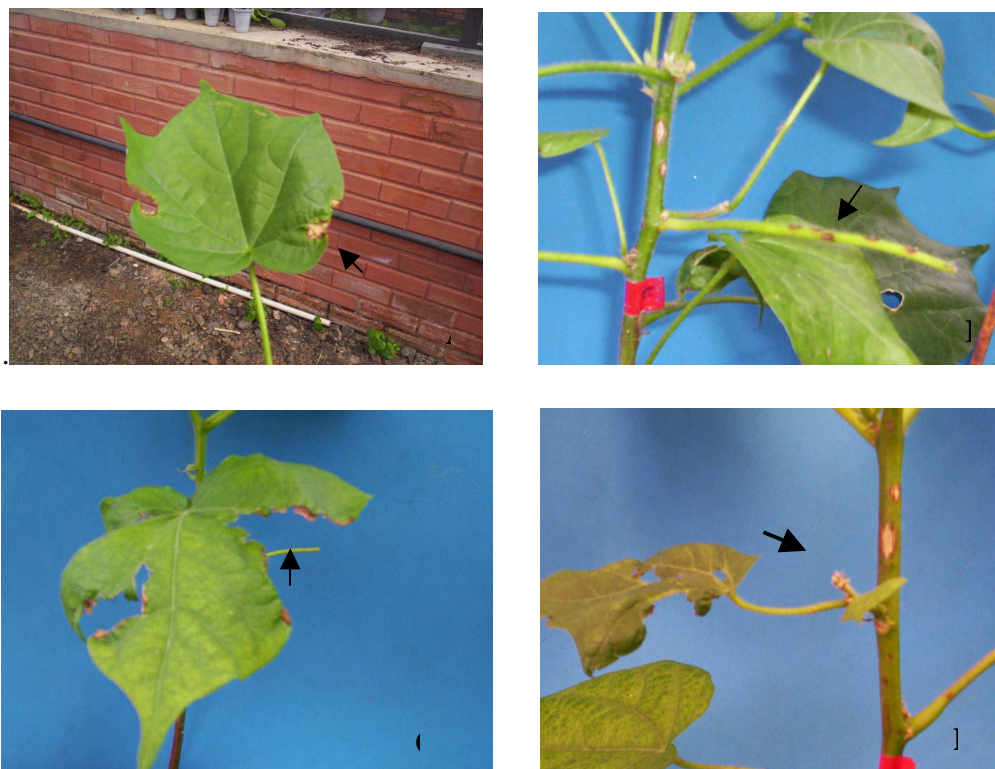


Figura 1. Sintomas de ramulose em cultivares de algodão. Cultivar BRS Antares: (A) Folha, (B) Haste; Cultivar BRS Cedro: (C) Folha, (D) Haste

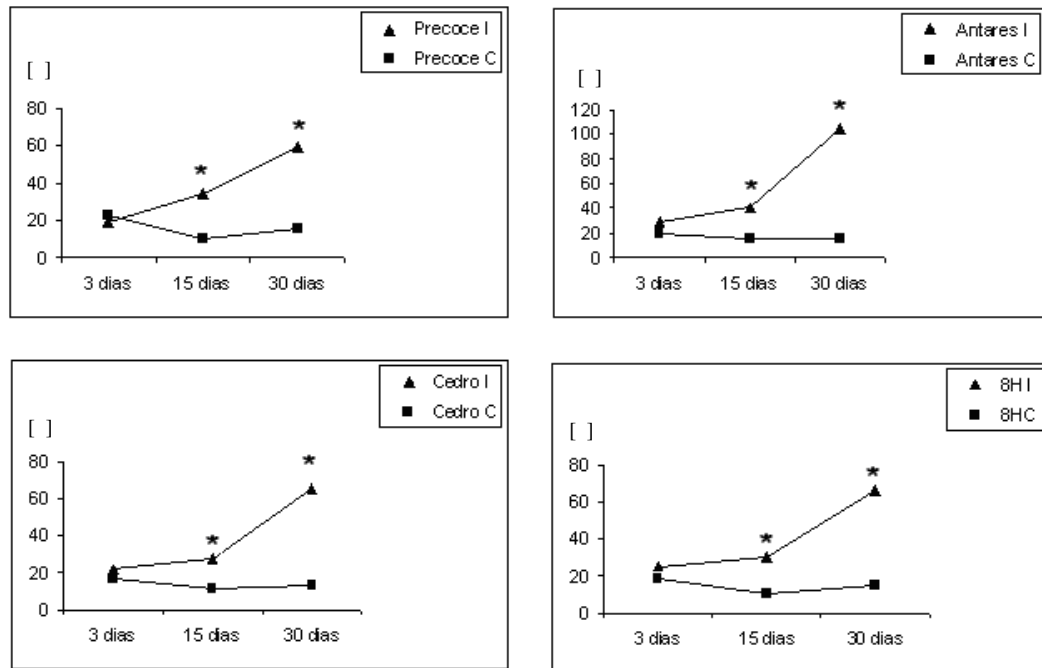
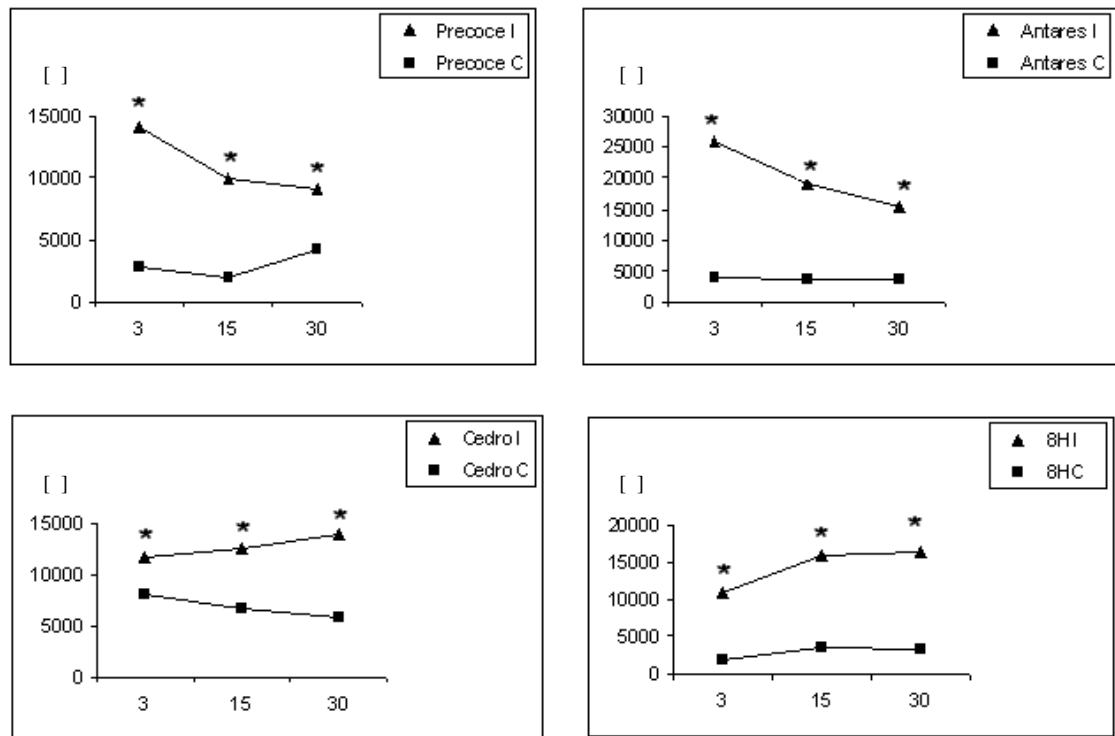


Figura 2. Teores de prolina ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamentos controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

A



B

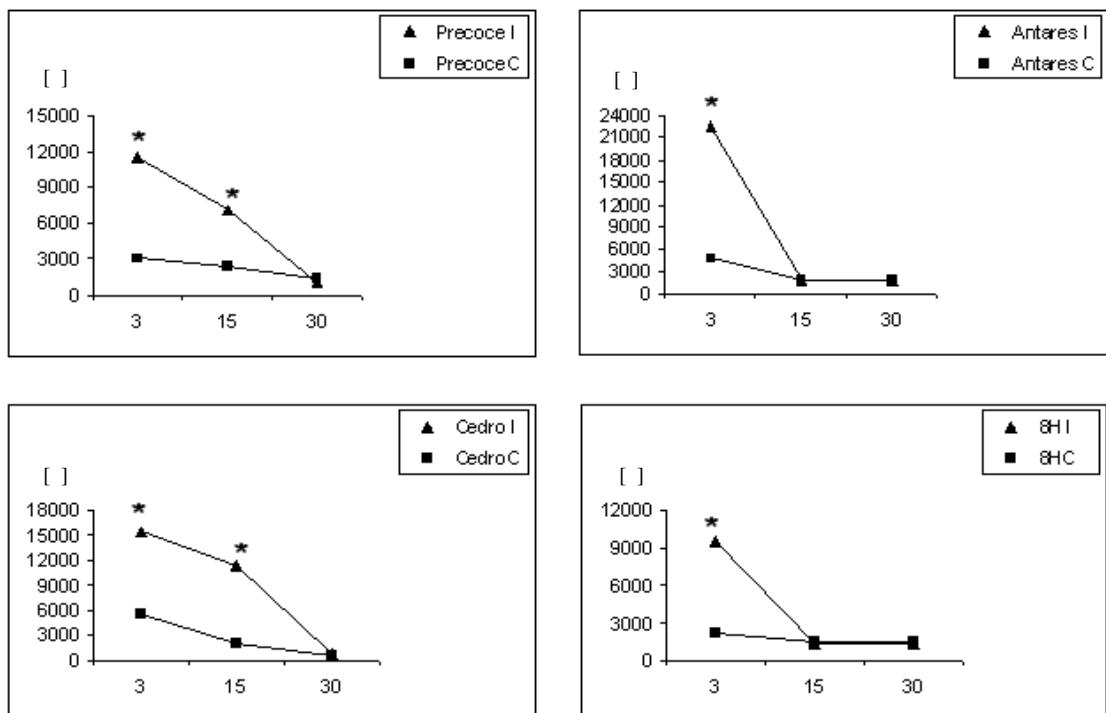


Figura 3. Teores das enzimas oxidativas *peroxidase* (U/mL) (A) e *catalase* (U/mL) (B) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

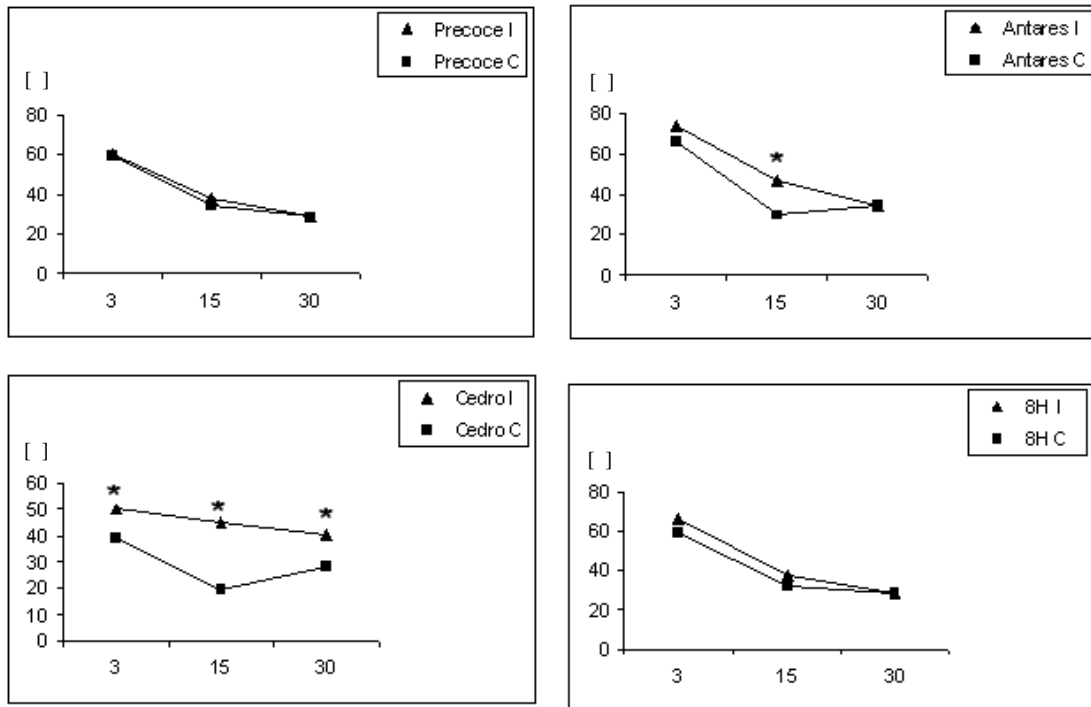


Figura 4. Teores de carboidratos ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

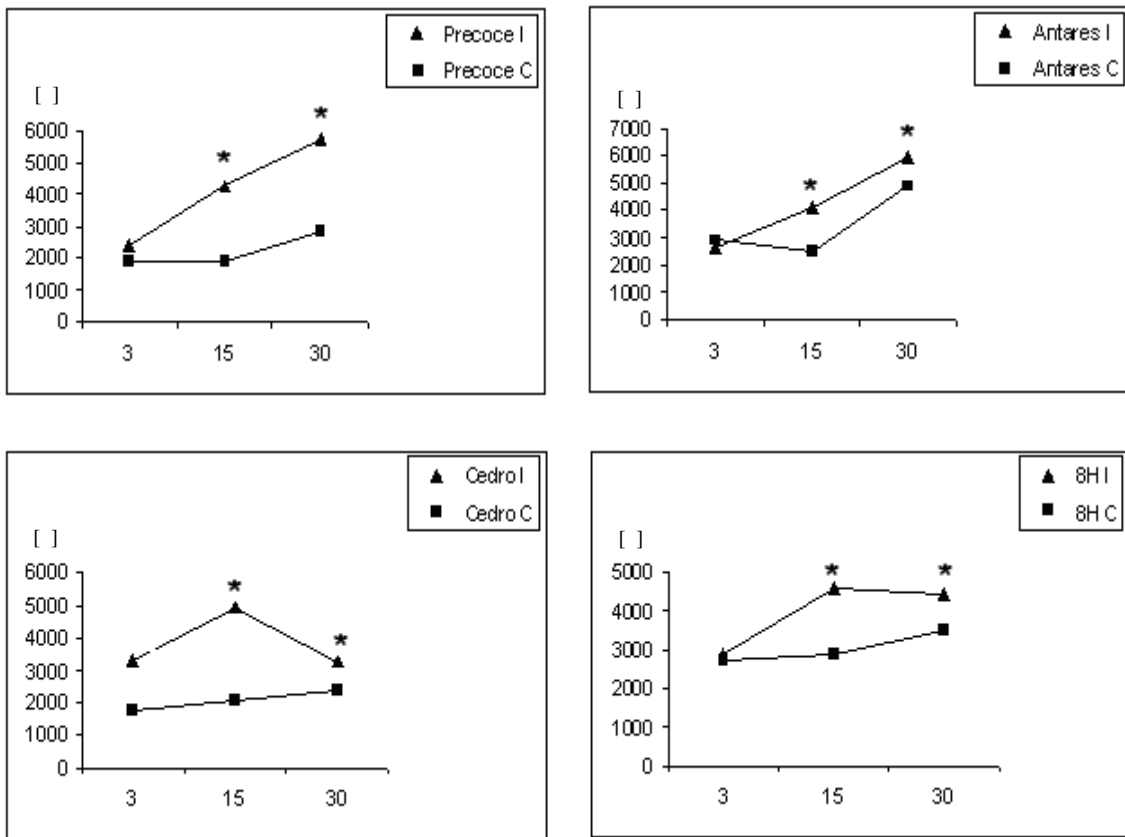


Figura 5. Teores de proteínas ($\mu\text{mol/g}$ de MF) em diferentes cultivares de algodão sob os tratamento controle e inoculado, aos 3, 15 e 30 dias após a inoculação. * Diferença estatística pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 1. Média das cultivares de algodão quanto ao teor de prolina, em três períodos de avaliação, quando submetidas a infecção com o fungo da ramulose

Período avaliado	Prolina ($\mu\text{mol/g}$ de MF)		Diferença em relação ao controle (%)
	Controle	Inoculado	
3	18,55B	24,07A	30
15	11,76B	31,63A	169
30	15,12B	69,53A	360
CV (%)	26,28		
Média	28,44		
F	135,62		
P < 5%	0,00		

Médias com a mesma letra não difere estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 2. Média das cultivares de algodão quanto ao teor de *catalase*, em três períodos de avaliação, quando submetidas a infecção com o fungo da ramulose

Período avaliado	<i>Catalase</i> (U/mL)		Diferença em relação ao controle (%)
	Controle	inoculado	
3	3856,33 B	14750,00 A	283
15	1911,83 B	5400,00 A	182
30	1308,33 B	1260,00 A	96
CV (%)	35,07		
Média	4747,75		
F	134,98		
P < 5%			

Médias com a mesma letra não difere estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade

Capítulo III

Identification of differentially expressed transcripts in cotton varieties
infected with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Artigo submetido à Revista European Journal of Plant Pathology

Identification of differentially expressed transcripts in cotton varieties infected with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Fabiana Aparecida Cavalcante Silva¹, Péricles de Albuquerque Melo Filho¹, Carliane Rebeca Coelho Silva¹ and Roseane Cavalcanti dos Santos^{2,*}

¹Agronomy Department, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, ² Embrapa Algodão, Biotechnology Area, CP 174, Campina Grande, PB, * Author for correspondence (Email: caval@cnpa.embrapa.br)

Abstract

Resistant and susceptible cotton cultivars - BRS Antares and CNPA Precoce I, respectively – were infected with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in order to identify differentially expressed transcripts related to plant defense mechanisms. Plants were sown in plastic containers in greenhouse and inoculation took place at 20 days after sowing. Each treatment was sprayed with a fungal suspension at 1×10^6 conidia/mL concentration and submitted to a humidity chamber for 72 hours. Control plants were sprayed with distilled water. Young leaves were collected to total RNA extraction at 3 and 15 days after inoculation (dai). To molecular procedures, 3dai leaves-RNA were used with ten pre-selected Operon series-primers for the RT-PCR reactions, which were performed at 35 °C annealing. Eight of these primers exhibited patterns with polymorphic bands but just five were selected for transcripts analysis. Differential expression was visualized in both

cultivars. At overall, 12 down regulation, 13 up regulation and 10 apparently active transcripts were registered. An apparently active transcript obtained from inoculated-resistant BRS Antares, with c.a. 200 bp (tV10), exhibited 86% homology with the *GmChl 3* gene (AB181949.1) that codifies to *Chlorophyllase III* in soybean plants. This enzyme is involved in protection processes of vegetal cells against oxidative damage and modulates the activation of different defense pathways. Dot blot analysis revealed that this transcript was also present in control plants and in infected cv. CNPA Precoce I, but in basal and low expressions respectively. Over-expression was confirmed in resistant cv. BRS Antares at 3 and 15 days after inoculation.

Key-words: biotic stress, disease, ramulosis, gene expression, *Gossypium*

Introduction

Plant diseases are important factors responsible for losses in crop production at worldwide level. On large farms, such as cotton, a number of different pathogens such as fungi, viruses, mycoplasmas, nematodes and bacteria cause severe crop damage (Cia and Salgado, 1997). Ramulosis caused by the fungus *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* stands out among main fungal diseases in cotton crop and, depending on the environmental conditions, can generate losses over than 60% in yield (Freire et al., 2007). The most effective control of this disease involves combined actions, such as resistant cultivars, treatment of seeds and crop rotation.

In Brazil, although there are sources with a high degree of resistance to ramulosis, cultivars are not produced on a commercial scale because they are not attractive from an agronomic standpoint (Suassuna and Coutinho 2007). Therefore, several strategies in Brazilian cotton improvement have been carried out in national

research companies aiming to incorporating the resistance traits in commercial cultivars. The use of resistant genotypes is one of the most effective forms of management in large farms due to the advantage of minimizing production costs, especially with chemical products often used to control diseases.

Although plants have several genetic mechanisms involved in the defense against phytopathogens, the response to invasion depends on the genetic makeup of each variety and its interaction with the environment. Recently, researches have focused on the identification of genes that codify for defense proteins (PR-Proteins). Studies of this nature have increased knowledge on how plants protect themselves against the progression of disease (Norman-Setterblad et al., 2000). The most well-known of these proteins are enzymes such as phytoalexins, defensine (Penninckx et al., 1996) and *Chlorophyllases* (Kariola et al, 2005). A number of researchers have demonstrated the role of these enzymes in the defense mechanisms of plants against phytopathogens. In cotton, Dubery and Slater (1997) reported a substantial increase in *Chitinase* and β -1,3- *glucanase* when cotton plants were infected with the fungus *Verticillium dahliae*. McFadden et al. (2001) obtained transcripts related to *phenylalanine-ammonia-lyase* genes with this same pathosystem.

The identification of genes associated to these mechanisms is relevant to the understanding of their functions and strategies and this information could be useful to assist in the laborious selection processes often employed in the genetic cotton improvement to resistance to disease. Several methodologies have been used in molecular biology aiming to gene identification and prospecting. In this study we report about identification of differentially expressed transcripts obtained in cotton plants infected with ramulosis, by means of RAPD-PCR tools.

Material and Methods

Planting and inoculation procedures

Cleaned and disinfected cotton seeds from ramulosis susceptible cv. CNPA Precoce I and resistant cv. BRS Antares (Freire et al., 2007; Suassuna and Coutinho, 2007) were cultivated in green house (Agronomy Dept., UFRPE), in 20 liter plastic containers containing previously sterilized and fertilized Latosoil soil, during middle winter, from July to August 2007. Plots were performed with 4 treatments: BRS Antares-control, CNPA Precoce I-control, BRS Antares-infected and CNPA Precoce I- infected. Each randomized treatment was performed with 10 containers containing 5 plants. Average daily and nightly temperatures and relative humidity of the air during the experiment were 29°C, 20°C and 83%, respectively. Irrigation by aspersion was daily maintained according plant necessities.

At 25 days after sowing, when plants exhibited ca. four definitive leaves, they were inoculated with a manual atomizer. The strain Cgc 287, from *C. gossypii* var. *cephalosporioides* obtained with symptoms of the disease in Montvidéu, GO, Brazil, was used to inoculation procedures. A concentration of 1.0×10^6 conidia mL⁻¹ was sprayed in plants from infected treatments. Control treatments were sprayed with distilled water. After inoculation, all plants were placed on a humidity chamber for 72h.

RNA extraction and PCR assays

Young leaves (1g), located at apical, region were collected on ice from each treatment for total RNA extraction, using Pure Link-Micro to Midi kit (Invitrogen). RNA

purity and concentration was analyzed in denaturant agarosis gel (1.2%) and quantification was performed in a spectrophotometer (Fenton). Ten decamer RAPD primers (Operon series) were pre-selected for the differential expression assays (Table 1). The reverse transcription reactions were conducted in a Mastercycler Gradiente Thermocycler using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Each reaction was performed in a final volume of 23 μ L containing 10 μ M of each oligonucleotide, 10 mM of dNTP mix, 1 μ g of RNA, 5X of the enzyme buffer, 0.1M of DTT, 40 U of RNAGuard (Invitrogen) and 20 U of M-MLV RT. The PCR reactions were performed in a volume of 30 μ l, containing 25 mM of MgCl₂, 10 mM of dNTP mix, 10 μ M of each primer, 10X of the enzyme buffer, 5 μ l of each cDNA and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The conditions of amplification were: 1 denaturing cycle (94 °C/5 min), 35 denaturing cycles (94 °C/15 seg), annealing (35 °C/30 seg) and extension (72 °C/1 min) and a final extension cycle at 72 °C/7 min. Amplification products were run in agarosis gel (1.2%), stained with Sybr Gold (Invitrogen) and photodocumented (Vilber Lourmat Photodocumentation).

Table 1

Purification of samples and cloning

Fragments obtained from transcripts apparently actives in inoculated plants were isolated from the gel and selected bands were cut out. DNA was purified with the SNAP kit (Invitrogen) and reamplified in 50 μ L PCR assays using the same respective primers that generated the products. A 3 μ l aliquot (20 ng/ μ L) of each fragment was used for cloning in the pGEMT-Easy vector (Promega) and incubated overnight at 4 oC. The clones were obtained from the *Escherichia coli*, One Top 10F'

cell (Invitrogen) and plasmid DNA (miniprep) was obtained with the Wizard kit (Promega). The molecular procedures followed the recommendations of the manufacturers.

DNA sequencing and homology searches

One aliquot of each miniprep (20 ng/ μ L) was used for sequencing in the Genetics, Biochemistry and DNA Sequencing Laboratory (Biology Dept., UFRPE), using the LPA Dynamic Terminator kit for the MegaBASE sequencer (Amersham Biosciences). The sequences were edited on the Chromas 2.3 Program (MFC Application) and putative function was assigned by comparison with the nonredundant nucleotide using the BlastN tool (Basic Local Alignment Search Tool) from the National Center for Biotechnology Information-NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Dot-blot analysis

RNA total (15 μ L) from inoculated and control samples obtained at 3 and 15 days after inoculation in both cultivars were analyzed by dot-blot according Jain et al., (2001). RNA samples were previously denatured under alkaline conditions and then dot-blotted onto a nitrocellulose membrane (Hybond N, Amersham). Membrane was double rinsed, first with 1 mL of denaturing solution (10 mM cold NaOH and 1mM EDTA) and after with 2X SSC, 0.1% SDS, both during 1 min at room temperature. RNA was UV crosslinked using the HL-2000 Hybrilinker (UPV Lab Products). After prehybridization (Sambrook et al., 1989), membrane was probed with a 200 bp PCR product obtained from apparently active transcript in inoculated cv. BRS Antares, with primer OPV10. Probe was labeled with biotin (BioNick labeling

System, Invitrogen). Hybridization was performed at 37 °C for 8 h. Then, membrane was washed according protocol described in Sambrook et al., (1989). Coloration reaction was performed in dark room, using 160 µL NBT (75 mg/mL)/ BCIP (50 mg/mL) substrates (Promega) in 10 mL of alkaline phosphatase buffer.

Results

Polymorphic patterns were visualized in eight of the whole primers used but differentially expressed transcripts were achieved in just five. Among them, 12 were down regulated, 3 up regulated and 10 were apparently activated. Figures 1 and 2 display band patterns generated in both control and inoculated plant samples; the highest number of apparently active transcripts was obtained in the resistant cv. BRS Antares under infected condition. The OPV10 primer provided more expressive results for this kind of transcripts (Table 1).

Figure 1 and 2

All apparently active transcripts were sequenced and just one (tV10, 200-bp, Figure 1C) was related to the defense mechanism against biotic and abiotic stresses, according results obtained from comparison of sequences using the BlastN tool from NCBI gene bank. This sample aligned with the *GmChl 1* gene (AB181947.1), which codifies for the *Chlorophyllase* III in soybean (*Glicine max*), exhibiting 86% identity (Figure 3). However, dot blot results showed that, in truth, tV10 is not an active transcript, but an over-expressed one revealed in a resistant cv. BRS Antares at 3 and 15 days after inoculation (Figure 4). Basal and low expression was verified in control plants and in susceptible inoculated-Precoce I, respectively.

Figure 3

Figure 4

Discussion

Plants are able to respond to diverse forms of environmental adversity depending on the type of stress to which they are submitted. One such response involves an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), such as O_2^- and hydrogen peroxide (H_2O_2). These products are normally synthesized by plants through respiratory and photosynthesis mechanisms in various organelles, principally mitochondria and chloroplasts (Greene, 2002). The greater stock of ROS in plants is found in the thylakoid membranes throughout the electron transport systems.

A number of studies have been carried out in the field of molecular biology with the aim of identifying transcripts related to plant defense against biotic stress. Using Suppression Subtractive Hybridization (SSH) on cotton plants, Zuo et al., (2005) obtained expressed sequence tags in plants infected with *Verticillium dahliae*, from which 1165 clones were analyzed. After selection through reverse northern blotting, it was observed that 131 expressed sequence tags were up regulated and 16 were down regulated; 83 exhibited homology with 45 unique sequences. The expressed sequence tags exhibited greater identity with the enzymes involved in the oxidative mechanism that were strongly expressed during infection. Dowd et al., (2004) found that, when infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectorum*, cotton plants exhibited changes in gene expression in the root tissue and hypocotyls, identifying PR genes related to pathogenicity and genes linked

to the biosynthesis of gossypol and lignin, which are agents of the defense response of the plant to the pathogen.

In the present study, the analysis of the band patterns obtained from the plants infected with the ramulosis revealed differences regarding transcript expression between the control and inoculated treatments. In some cases, there was a greater intensity in bands in the control than in infected sample; these were denominated down regulated. When a similar behavior took place in the inoculated plants, over than in control ones, they were classified as up regulated. The purpose of this study, however, was focused on the apparently active bands, observed in just infected plants.

The result obtained with the tV10-200bp transcript, identified as *Chlorophyllase* III in cv. BRS Antares is relevant as to biochemical and molecular aspects regarding the metabolic pathways in which this enzyme is involved. As seen in Figure 4, high expression of this enzyme was verified at 3 and 15 days after inoculation just in a resistant cultivar. It suggests that the resistance process in this cultivar moves forward by hours after infection taking in account the expression verified in both samples. In literature, others secondary metabolites have showed this behavior in the resistant cultivars. Silva (2008) submitted four cotton cultivars to *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and verified high expression of catalase, peroxidase and proline in cv. BRS Antares during the first 15 days after inoculation and justifies this behavior as one of the defense processes of cultivar against the fungus. This results was also reported by others authors working with resistant cultivar from several crops, as *Arabidopsis thaliana* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Fabro et al., 2004), *Pyrus communis* with *Erwinia amylovora* (Honty et al.,

2005) and *Pisum sativum* with *Fusarium oxysporum* and *F. solani* (Luhová et al., 2006).

Several events related to infection take place in the first 24 hours. Martinez et al., (2000), point out that oxidative burst takes place 3 hours after infection and is characterized by ROS production, mainly H₂O₂. According several authors, H₂O₂ is a key molecule in plant resistance to pathogenic microbes (Leon et al., 1995, Wu et al., 1997, Alvarez et al., 1998).

In respect to *Chlorophyllase*, Takamiya et al., (2000) stated that this enzyme (*chlorophyll-chlorophyllido hydrolase*; EC 3.1.1.14) is the first enzyme generated in the degradation pathway of chlorophylls. Biotic and abiotic stresses are responsible for causing damage to vegetal tissue, requiring a repair mechanism such as the release of chlorophyll in the thylakoid membranes. However, when in excess, these chlorophyll particles need to be quickly eliminated in order to avoid cell damage due to their photodynamic action, that is, their capacity to generate singlet oxygen (¹O₂), a type of oxygen reactive species (ROS). Failure in the removal of chlorophyll can increase the production of ROS, the toxic effect of which could be lethal to the cells.

In *Arabidopsis thaliana*, Benedetti and Arruda (2002) observed that two genes codified for *Chlorophyllase*: *AtCLH1* and *AtCLH2*. The induction of these genes was observed in response to the methyl-jasmonate resistance inductor. Thus, *Chlorophyllases* are directly involved in the mechanism for avoiding damage due to the accumulation of ROS. Kariola et al., (2004) observed that *Chlorophyllase 1* (gene *AtCLH1*) in *Arabidopsis thaliana* is quickly induced in tissue damaged by the necrotrophic bacterium *Erwinia carotovora* or the fungus *Alternaria brassicicola*. These authors demonstrated that, besides protecting from oxidative damage,

chlorophyllase also acts on vegetal tissue, modulating the activation of different defense pathways.

The results from the present study broaden the perspective for further studies on defense pathways of plants against pathogens. The transcript described here exhibited 86% homology with the *AtCLH3* gene that codifies for *Chlorophyllase* III in soybean plants and may be used as a probe for selecting cotton lines with resistance to ramulosis or for further studies aiming to elucidation of the routes where this enzyme is involved in plant defense mechanisms. This gene, which in soybean is about 1.2 kb, is also found in other crops, such as *Nicotiana tabacum* (EU294210.1), *Brassica oleraceae* (AF337546), *Arabidopsis thaliana* (NM_123753) and *Ginkgo biloba* (AY292526).

Acknowledgments

The authors are grateful to Embrapa Algodão for financial support and to CAPES for the grant.

References

- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. & Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92, 773-784
- Benedetti, C. & Arruda, P. (2002). Altering the expression of the *Chlorophyllase* gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-tochlorophyllide ratio. *Plant Physiology*, 128, 1255-1263
- Cia, E. & Salgado, C. L. (1997). Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.). (In H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin-filho, L. E. A. Camargo & J. A. M. Rezende (Eds.), Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas (pp.33-48). São Paulo: Agronômica Ceres.)
- Dowd, C. I., Wilson, W. & McFadden, H. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17, 654–667.
- Dubery, I. A. & Slater, V. (1997). Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry*, 44(8): 1429-1434.
- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L. & Alvarez, M.E. (2004). Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plantpathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17, 343–350

Freire, E. C., Morello, C. L. & Farias, F. J. C. (2007). Melhoramento do algodoeiro no Cerrado. (In E.C. Freire (Eds.), Algodão no cerrado do Brasil (pp. 479-521). Brasília: ABRAPA)

Grene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. (In C.R. Somerville & E.M. Meyerowitz (Eds), The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists (pp.1-20). Rockville: MD)

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

Jain, A.K., Basha, S.M., Holbrook, C.C. (2001). Identification of drought-responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L). *Journal of Biotechnology*, 4, 59-67

Kariola, T., Brader, G., Li, J. & Palva, E. T. (2005). Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell*, 17, 282–294

Leon, J., Lawton, M.A. & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxyde stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 108, 11673-1678

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. Solan. Biologia Plantarum*, 50(4), 675-682

Martinez, C., Baccou, J-C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J-F., Jalloul, A., Montillet, J-L., Geiger, J.P., Assigbetse, K. & Nicole, M. (2000). Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *Plant Physiology*, 122, 757–766

McFadden, H. G., Chapple, R. & Fayter, R. (2001). Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 58, 119-132

Norman-Setterblad, C., Vidal, S. & Palva, E. T. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4, 430–438

Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J-P., Manners, J.M. & Broekaert, W.F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 8, 2309–2323

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Harbor NY Cold Spring Harbor Lab.

Silva, F.A.C. (2008). Estudo molecular e bioquímico de cultivares de algodão em resposta a *Colletotrichum gossypii* south var. *cephalosporioides* A.S. Costa. Dissertação. Universidade Federal Rural de Pernambuco

Suassuna, N. D., Coutinho, W. M. (2007). Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. (In E.C. Freire (Eds.), Algodão no cerrado do Brasil (pp. 479-521). Brasília: ABRAPA)

Takamiya, K. I., Tsuchiya, T. & Ohta, H. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed ?. *Trends Plant Science*, 5, 426–43

Zuo, K., Wang, J., Wu, W., Cha, Y., Sun, X. & Tang, K. (2005). Identification and characterization of differentially expressed ESTs of *Gossypium barbadense* infected by *Verticillium dahliae* with suppression subtractive hybridization. *Molecular Biology*, 39(2):191-199.

Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. & Shah, D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology*, 115, 427-435

List of Figures

Figure 1. Differentially displayed bands in RT-PCR of total RNA extracted from inoculated and control cotton cultivars using follows primers: OPH 03 (A), OPP 06 (B), OPV 10 (C), OPG 05 (D). AC- BRS Antares-control, AI- BRS Antares-inoculated, PCCNPA Precoce I-control, PI- CNPA Precoce I-inoculated. Marker: Ladder plus 1Kb (Invitrogen). Arrows: \blacktriangleleft down regulation, \blacktriangleup up regulation, \rightarrow actived

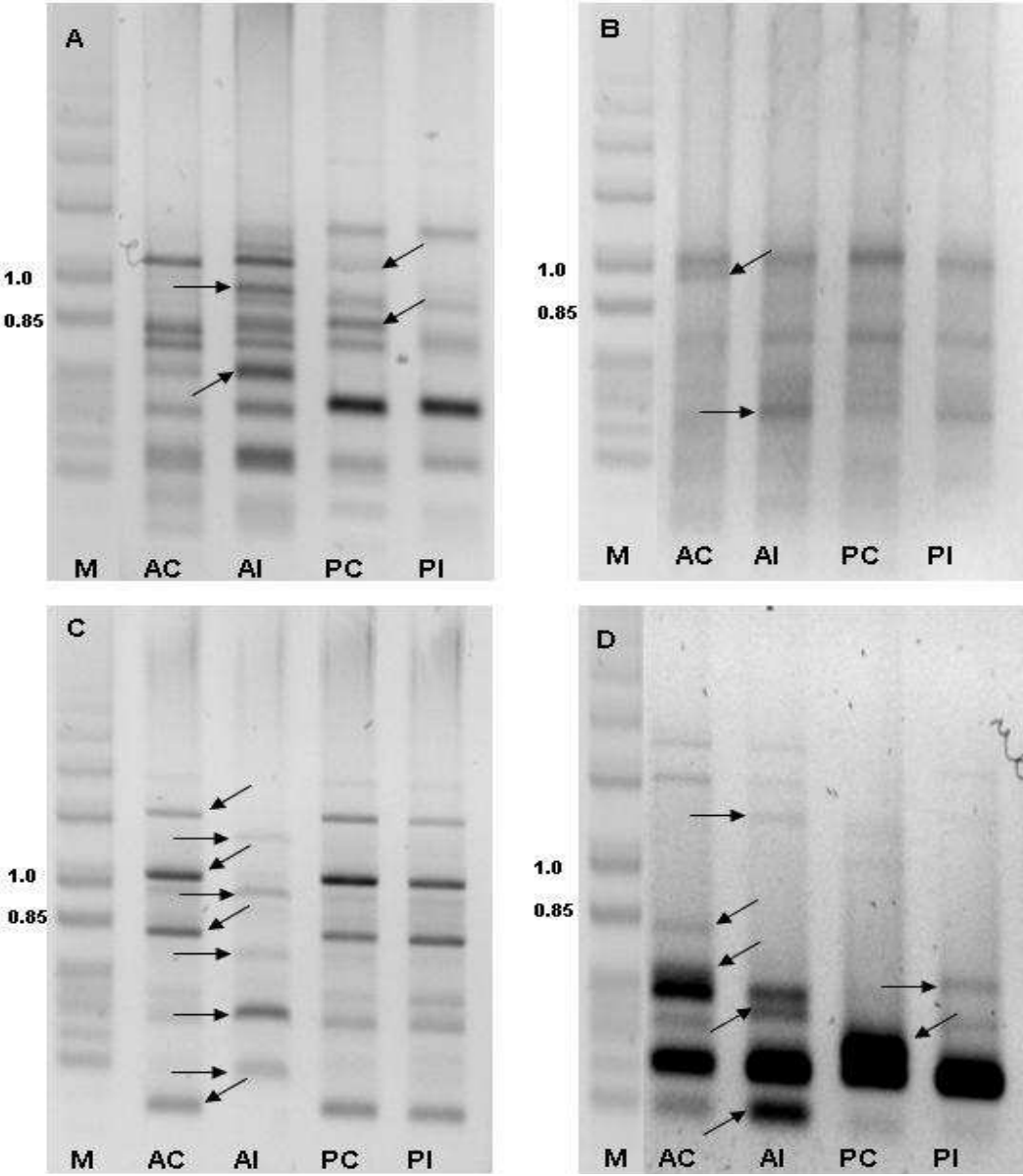
Figure 2. Differentially displayed bands in RT-PCR of total RNA extracted from inoculated and control cotton cultivars using follows primers: OPE 18 (A), OPL 03 (B), OPA 4 (C), OPW 13 (D). AC- BRS Antares-control, AI- BRS Antares-inoculated, PCCNPA Precoce I-control, PI- CNPA Precoce I-inoculated. Marker: Ladder plus 1Kb (Invitrogen). Arrows: \blacktriangleleft down regulation, \blacktriangleup up regulation, \rightarrow actived

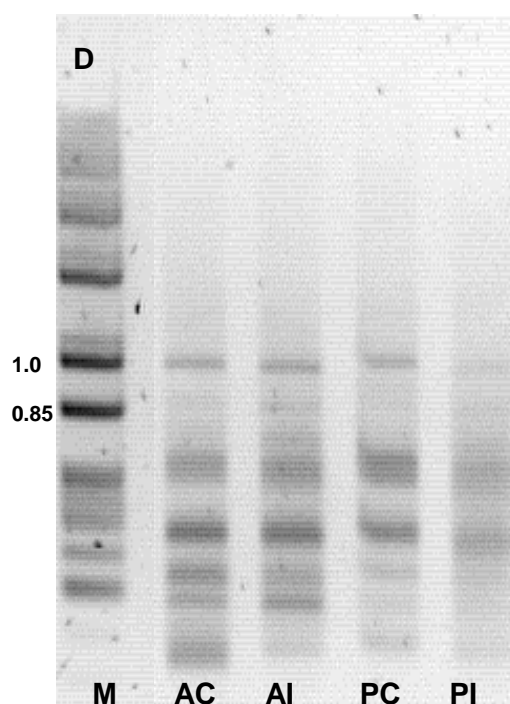
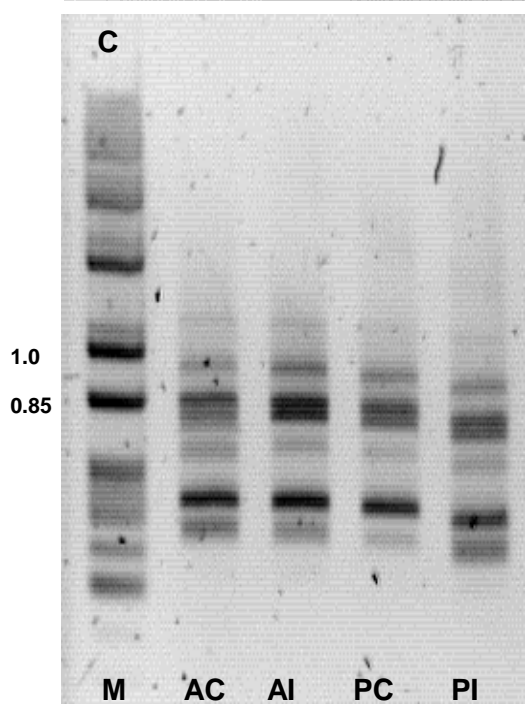
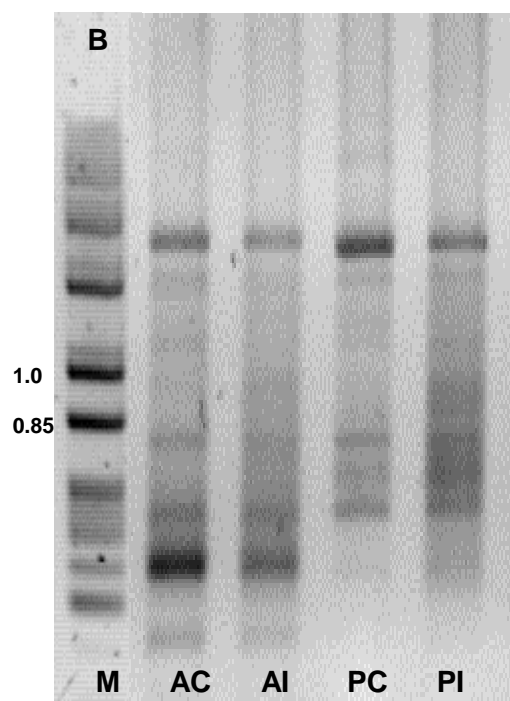
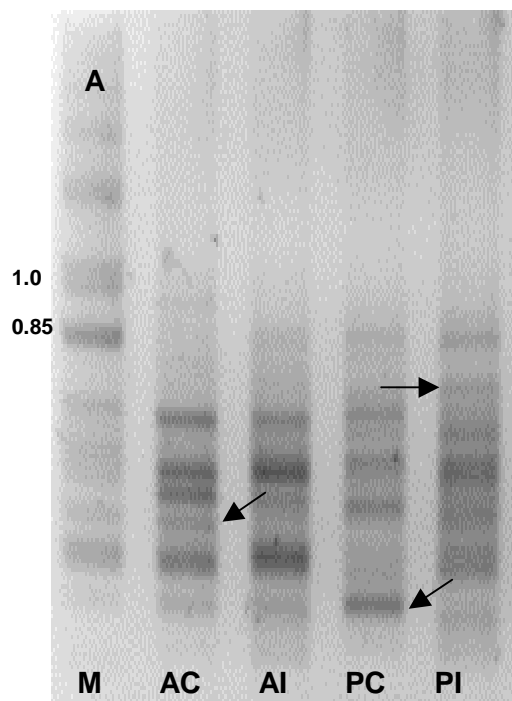
Figure 3. Result of BLAST alignment between tV10-200bp and *GmChl 3* gene (AB181949.1) that codifies to *Chlorophyllase III*, in soybean (*Glycine max* L.).

Figure 4. Dot-blot analysis in inoculated and control cotton cultivars for identification of a specific transcript related to disease resistance. AC- BRS Antares, control, AI- BRS Antares, inoculated, PC- CNPA Precoce I, control, PI- CNPA Precoce I, inoculated. Dai- days after inoculation.

List of Table*Table 1.* Differentially expressed transcripts obtained with RAPD primers in cotton cultivars submitted to ramulosis.

Primers	Sequence	Transcripts		
		Down-regulated	Up-regulated	Active
OPA V10	GGACCTGCTG	4	0	5
OPA G05	CTGAGACGGA	3	2	2
OPA H03	AGACGTCCAC	2	1	1
OPA E18	GGACTGCAGA	2	0	1
OPA L03	CCAGCAGCTT	0	0	0
OPA P06	GTGGGCTGAC	1	0	1
OPA A04	AATCGGGCTG	0	0	0
OPA W13	CACAGCGACA	0	0	0
OPA G04	AGCGTGTCTG	0	0	0
OPA X11	GGAGCCTCAG	0	0	0
Total	-	12	3	10





```

dbj|AB181949.1| Glycine max GmChl 3 gene for Chlorophyllase 3,
complete cds. Length=1229.

Score = 102 bits (112)          Expect = 5e-19
Identities = 76/88 (86%)       Gaps = 12/88 (13%)

dbj|AB181949.1| 24 TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG-CCGACGTCGCATGCTC-----CCGG 72
                   |||
V10-200p         5 TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCACCGG 64

dbj|AB181949.1| 73 CCGCCATGGCGCCGCGGG-ATTCGATT 99
                   |||
V10-200p         65 CCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGATT 92
    
```



CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Os teores de prolina e catalase devem ser utilizados como marcadores bioquímicos para a seleção de genótipos de algodão resistentes a ramulose
- Os compostos carboidratos solúveis e proteínas totais não devem ser recomendados como marcadores bioquímicos para identificação de genótipos de algodão resistentes a ramulose.
- Transcritos diferencialmente expressos podem ser identificados por meio de marcadores do tipo RAPD em plantas de algodão inoculadas com o fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa.
- O gene da *clorofilase 3* pode se constituir em um marcador funcional para seleção de plantas resistentes submetidas a estresse biótico.

ANEXOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES - FITOPATOLOGIA BRASILEIRA

ISSN 0100-4158 *versão impressa*

ISSN 1678-4677 *versão online*

Escopo do periódico

Fitopatologia Brasileira (FB) destina-se à publicação de artigos técnico-científicos, que descrevam pesquisas originais em Fitopatologia e contribuam significativamente para seu desenvolvimento. **FB** aceita trabalhos escritos em Português, Inglês e Espanhol. Trabalhos que apenas descrevem materiais ou métodos sem aplicá-los à pesquisa em Fitopatologia não são, em geral, aceitos, bem como aqueles que tratam de temas que diferem apenas em pequenos detalhes de pesquisas já publicadas. A submissão do trabalho implica que os autores aceitam as normas da revista, ficando implícito que o mesmo não esteja submetido para publicação em outro periódico. Está também implícito que, no desenvolvimento do trabalho, os aspectos éticos, respeito à legislação vigente do "copyright" e as normas de segurança em relação ao consumidor foram também observadas. Manuscritos submetidos em desacordo com as normas não serão considerados

Preparação de manuscritos

ESTILO E FORMATO

Os manuscritos devem ser apresentados em três vias, original e duas cópias, digitados em espaço duplo, com margens de 3 cm. As páginas devem ser numeradas e as linhas devem ter numeração contínua, inclusive da página inicial. Recomenda-se a utilização da fonte "Times New Roman", com tamanho de fonte 11. O texto deve ser escrito no tempo passado do verbo na forma impessoal. O autor deve seguir seu próprio estilo, tendo em mente a concisão e a clareza do texto. Para orientar-se em relação ao estilo e formato dos diversos tipos de trabalhos, recomenda-se aos autores consultar fascículos recentes da revista e levar em conta as orientações sobre cada seção do manuscrito que seguem.

Página inicial - Deve conter o título, nome dos autores, endereço da instituição,

departamento ou setor do local onde o trabalho foi realizado sem abreviações, endereços de E-mail, data de aceitação do manuscrito, autor para correspondência e linha de referência do trabalho. Em caso de trabalhos resultados de cursos de Pós-Graduação, a instituição e ano da defesa devem ser indicados no rodapé, assim como o endereço do primeiro autor quando diferente do local de execução.

Título - Deve ser conciso, claro e indicar objetivamente o assunto tratado, não maior que 150 caracteres; é apresentado em letra inicial maiúscula e nomes científicos em itálico, sem indicação das autoridades. Os autores devem lembrar que o título é a parte do trabalho que é lido com mais frequência e que recebe mais atenção.

Nomes dos autores - O primeiro e último nome dos autores devem ser apresentados por extenso, abreviando para a primeira letra os nomes de família intermediários e pré-nomes, mas não os nomes como Júnior, Filho, Neto.

Filiação institucional dos autores - Indicar, por extenso, o nome da instituição a que o autor está filiado, por ordem de hierarquia crescente, como Departamento, Laboratório ou Seção; unidade como Faculdade, Escola, Centro, Instituto ou Núcleo; instituição como Universidade, Secretaria de Estado ou Empresa; seguido de CEP, cidade, Estado e endereço de E-mail. Não usar abreviações do nome de instituições, nem traduzir seu nome. Todos os elementos do mesmo endereço são separados por vírgula, entre endereços o separador é o ponto-e-vírgula.

Referência do trabalho - Seguir as normas de referência bibliográfica.

Resumo - Deve condensar o conteúdo, expondo objetivos, indicar materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras, tudo escrito em um único parágrafo.

Palavras-chave adicionais - não devem repetir termos que se acham no título, podem ser constituídos de frases curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula.

Abstract - Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima ao resumo. Não deverá ter termos abreviados, comuns na linguagem local, como por exemplo, SP para São Paulo, ou NE para nordeste etc., pois será lido por pessoas de outros países e será usado por serviços de indexação que dão visibilidade para a produção científica nacional. É geralmente a parte que mais recebe atenção.

Additional Keywords - Representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

Introdução - Deve apresentar uma visão concisa do estado atual do conhecimento sobre o assunto que o manuscrito aborda e enfatizar a relevância do estudo, sem constituir-se em extensa revisão. Indica, na parte final, claramente os objetivos da pesquisa.

Material e Métodos - Esse item sempre deve conter informações suficientes para que outros possam repetir o trabalho. Esta seção pode ser dividida por subtítulos, indicados em negrito, em número parcimonioso. Métodos devem ser brevemente descritos, mesmo sendo comuns ou já descritos em outros veículos de publicação, indicando a fonte. Métodos novos ou modificados devem ser apresentados com detalhes, que garantam a reprodutibilidade da pesquisa.

Resultados - Deve descrever, de modo conciso, a lógica da investigação e suas descobertas. No texto, não se deve repetir, mas apenas fazer referência, aos dados ilustrados em tabelas ou gráficos e figuras. A interpretação dos resultados pertence à Discussão. A seção pode ter seções, indicadas por sub-títulos descritivos concisos e em negrito. Uma análise estatística que evidencie a significância dos dados é, geralmente, indispensável.

Discussão - Deve relacionar os resultados com trabalhos anteriores e interpretá-los. Pode levantar hipóteses baseadas nos dados do trabalho relatado e pode repetir partes da Introdução e recapitular aspectos essenciais da seção de Resultados. As seções Resultados e Discussão podem ser combinadas e divididas em subseções, com subtítulos concisos e descritivos. NÃO HÁ CONCLUSOES

Agradecimentos - Devem fazer referência a apoios recebidos de qualquer natureza, sejam esses de natureza financeira, indicando o doador de bolsas, a procedência e código de processo de recursos financeiros recebidos para execução de projetos, ou de natureza intelectual, indicando infra-estrutura, materiais ou pessoas, especificando a contribuição recebida.

Referências Bibliográficas - Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria. Normas para citação no texto: Souza & Silva (2005) ou (Souza & Silva, 2005 NÃO É MAIUSCULA!!). Quando houver mais de dois autores, usar a forma reduzida a exemplo de Souza et al NÃO É ITALICO (2005) ou (Souza et al., 2005). Referências a trabalhos dos mesmos autores, no mesmo ano, devem ser diferenciadas no texto e na lista de referências

por letras a, b, c, etc. como, por exemplo, Silva (1995 a, b) ou Silva et al. (1995a, b).

Na seção própria, as referências bibliográficas devem ser listadas em ordem alfabética do sobrenome. Referências com dois ou mais autores devem ser listados na ordem cronológica, depois de todos os trabalhos do primeiro autor. A referência deve incluir o nome de todos os autores, o título, o nome do periódico por extenso, as páginas inicial e final. A seguir, exemplos específicos.

Artigo

REIS, R.F., GOES, A. & TIMMER L.W. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira** 31:29-34. 2007.

ARNOLD, A.E., MEDJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. & HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 26:15649-15654. 2003.

Capítulo de livro

CAMPOS, V.P. & VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford UK. CAB International. 2005. pp. 529-580.

CRAIG, J. Sorghum Downy Mildew. In: Frederiksen, R.A. (Ed.) *Compendium of sorghum diseases*. Saint Paul MN. APS Press. 1986. pp. 39-40.

Livro

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2005.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C. & STALPERS J.A. *Dictionary of the Fungi*. 9th. Ed. Wallingford UK. CAB International. 2001.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. *Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres. 2005.

Tese e Dissertação

SOUZA M.V. *Caracterização parcial de um fragmento e detecção por rt-PCR de Rice stripe*

necrosis virus. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

BARBOSA M.A.G. Indutores químicos, enzimas envolvidas na resposta de defesa e custo fisiológico da indução. Tese de Doutorado. Recife PE. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2007.

CÂMARA, M.P.S. Taxonomy of Ophiosphaerella, Paraphaeosphaeria and Phaeosphaeria: a molecular and morphological approach. PhD Thesis. Pennsylvania PA. Pennsylvania State University. 1999.

BHAT, M.G. Studies on inheritance of resistance to downy mildew *Peronosclerospora sorghi* (Weston and Uppal) Shaw in sorghum. Master Thesis. Bangalore, Índia. University of Agricultural Science. 1981.

GIMENES-FERNANDES, N. Método de avaliação e herança da resistência a *Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) C.G. Shaw em sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Tese de Livre Docência. Jaboticabal SP. Universidade Estadual Paulista. 1981.

Resumos e Abstracts em evento científico

FREITAS-ASTUA, J., LOCALI, E.C., ANTONIOLI, R.; ASTUA-MONGE, G., TARGON, M.L.P. & MACHADO, M.A. Multiplex RT-PCR for the detection of the most important citrus viruses in Brazil. Proceedings, X. International Congress of Citriculture, Agadir. 2004. p. 95.

BETTIOL, W., SILVA, H.S.A, GALVÃO, J.A.H. & FURLANI, P.R. Controle de oídio em cultivo hidropônico de alface com leite de vaca. Resumos, 8ª. Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, Ilhéus BA. 2003. pp. 138-139.

PAWAR, M.N., FREDERIKSEN, R.A., MUGHOGHO, L.K. & BONDE, M.R. Survey of the virulence of *Peronosclerospora sorghi* isolates from India, Ethiopia, Nigeria, Texas (USA), Honduras, Brazil and Argentina. *Phytopathology* 75:1374. 1985. (Abstract)

LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, E.C.S., LIMA, G.S.A. & ZERBINI JUNIOR, F.M. Analysis of the Sw-5 mediated resistance response to tospovirus species. *Vírus: Reviews and Research* 4:154. 1999. (Abstract)

LIMA, C.S., PFENNING, L.H., COSTA, S.S., CAMPOS, M. A. & LESLIE, J.F. Amplified Length Polymorphisms Analysis of *Fusarium* species associated with mango malformation.

Fitopatologia Brasileira 30(Supl.):74. 2005. (Resumo)

Trabalhos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, podem ser citados como "no prelo" na lista de referências. No momento da entrega da versão final do manuscrito, deve ser apresentada a evidência de aceitação. Trabalhos ainda não aceitos podem ser citados no texto, como resultados não publicados, citando as iniciais e o sobrenome de todos os autores; entretanto, sua utilização não é recomendada; referências a "manuscritos submetidos", relatórios; "mimeografados" e "manuscritos em preparação" não são permitidas como não o são as citações de citações. Informações utilizadas proveniente de "Comunicação Pessoal" devem ser comprovadas por carta das pessoas citadas.

Ilustrações: o tamanho da página impressa da revista é de 176 x 235 mm e o texto, apresentado em duas colunas de 85 x 235 mm. A diagramação das fotos e gráficos deverá ter essas dimensões por base. Procure calcular as eventuais reduções ou ampliações que as figuras sofrerão tendo em mente essas dimensões. As ilustrações deverão seguir o mesmo estilo; devem ser "emolduradas" por linhas simples e vir acompanhadas das respectivas legendas e no verso identificadas com o nome dos autores. Os gráficos deverão ser feitos em papel branco.

Tabelas - deverão ostentar um título conciso e serem auto-explicativas, sem referência ao texto. Notas explicativas de rodapé devem ser curtas e indicadas preferentemente por símbolos ou letras. As linhas horizontais só devem aparecer separando o cabeçalho da tabela do título e do conteúdo da tabela, e uma ao final da tabela. A linha que separa o cabeçalho do título deve ser dupla. Não incluir linhas verticais, nem mesmo no cabeçalho. As linhas verticais que separam as colunas não devem aparecer, nem mesmo no cabeçalho. Evite tabelas muito grandes e que apresentem colunas e/ou linhas sem dados. Devem ser impressas em espaço duplo e em folha separada e numeradas na ordem em que são citadas no texto.

Figuras - devem ser empregadas seletivamente para demonstrar pontos importantes e específicos; devem levar em conta a clareza e a economia de espaço. As legendas devem vir em folhas separadas e não devem repetir a seção de Métodos. Elas precisam ser numeradas na ordem que aparecem no texto e partes de uma única figura devem ser designadas (a), (b), etc. e etiquetadas como tal na figura. Não serão aceitas figuras que dupliquem informações encontradas em tabela e / ou texto.

Desenhos - devem ter qualidade que permita a reprodução direta e serem apresentados em tamanho duas vezes o tamanho em que aparecerão na página impressa. Podem ser submetidos como: (a) desenho original de linhas em preto sobre papel branco; (b) fotografia

direta do original e (c) desenhos produzidos por programa de computador, impressos com qualidade para reprodução direta. Não são aceitos gráficos e/ou desenhos excessivamente elaborados, com desnecessária apresentação em três dimensões, quando se referirem a duas variáveis. O tamanho dos símbolos e a espessura das linhas devem ser escolhidos, tendo-se em mente a clareza e a proporção.

Fotografias - as fotos deverão ser em preto-e-branco, em resolução mínima de 300dpi, apresentadas em formato JPEG e no tamanho aproximado em que aparecerão na revista. Se houver várias fotos, procure montá-las formando um conjunto, igualando ao máximo suas tonalidades; não deixe espaços em branco entre as fotos. No caso de micrografias, indicar o aumento com uma barra, na própria foto. Numerar as fotos consecutivamente na ordem em que elas aparecem no texto. Para reprodução de fotos coloridas, é cobrada dos autores uma contribuição no valor de R\$ 300,00 por página, cobrindo o custo de produção do fotolito de separação de cores.

Reações sorológicas e padrões eletroforéticos - devem ser submetidos na forma de fotografias de bom contraste, não sendo aceitáveis desenhos representativos.

Gráficos e imagens geradas digitais - devem ser gerados em programas compatíveis com o sistema Windows, de preferência com "Corel Draw". Levar em conta as dimensões da página da revista e considerar a proporcionalidade das figuras em relação ao tamanho das letras, números e símbolos. Evite elaborar demais os gráficos, com um número excessivo de linhas, barras ou símbolos.

PROCESSAMENTO DO MANUSCRITO

O Presidente da Comissão Editorial designará um Editor Associado para a análise de cada manuscrito, após examiná-lo para assegurar-se que o tema tratado está de acordo com o escopo da revista **Fitopatologia Brasileira**. No parecer de pré-análise, o Editor Associado indicará dois ou três revisores *ad hoc* do manuscrito, recomendará sua devolução aos autores para modificação de conteúdo ou formato, ou rejeitará o manuscrito na forma apresentada. Sobre os trabalhos pré-selecionados, os revisores *ad hoc* apresentarão à Comissão Editorial pareceres avaliando a originalidade e relevância do trabalho, adequação da metodologia empregada e coerência em relação aos objetivos indicados, recomendando ou não o manuscrito para publicação. Independente de seu julgamento, espera-se dos revisores que apresentem sugestões para o aprimoramento do trabalho ou até mesmo indicação de experimentos adicionais que devem ser feitos em apoio dos fatos relatados.

Estes pareceres serão enviados pelo Presidente da Comissão Editorial ao Editor Associado que os analisará e emitirá parecer conclusivo sobre o manuscrito, numa das seguintes formas: (a) aceito sem modificações; (b) aceito com modificações ou (c) não aceito para publicação. Por modificações entende-se: atualização bibliográfica, mudanças na metodologia, realização de experimentos complementares etc. A aceitação com modificações implica que o manuscrito precisa sofrer correções que podem ser feitas pelo autor em não mais do que três meses do recebimento do manuscrito com as correções. Em qualquer uma das hipóteses, o manuscrito é devolvido ao autor para conhecimento dos pareceres, da opinião do Editor Associado e da decisão final do Presidente da Comissão Editorial. No caso das hipóteses (a) e (b), o autor deve produzir uma versão final do manuscrito, incorporando as sugestões, realizando as edições necessárias e promovendo as reformulações indicadas. Duas cópias desta versão final devem ser enviadas à Comissão Editorial, acompanhada de um CD ou disquete onde está gravada a versão corrigida do manuscrito e os elementos gráficos, em arquivos separados. Manuscritos de trabalhos não aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.

Utilização da versão gravada em CD ou disquete - as seguintes orientações devem ser consideradas, quando a versão final for remetida. O CD ou disquete deve ser etiquetado, indicando claramente o número de registro do manuscrito, nome do primeiro autor, bem como o nome do arquivo. É da inteira responsabilidade do autor assegurar que a versão gravada em disquete seja a reprodução exata da cópia em papel aceita para publicação. Disquetes não serão devolvidos a não ser que isto seja solicitado pelo autor. É de inteira responsabilidade do autor assegurar que a versão gravada seja a reprodução exata da cópia em papel aceita para publicação. CD e disquetes não serão devolvidos a não ser que seja solicitado pelo autor.

Prova Tipográfica - uma cópia da prova tipográfica do manuscrito será remetida para o autor para correspondência, que deverá fazer as possíveis e necessárias correções e devolvê-la em 48 horas. Correções extensivas do texto do manuscrito, cujo formato e conteúdo já foram aprovados para publicação, não são aceitáveis. Alterações, adições, deleções e edições implicarão em novo exame do manuscrito pela Comissão Editorial e produção de outra prova tipográfica.. Erros e omissões presentes no texto da prova tipográfica, corrigido e devolvido à Comissão Editorial, são de inteira responsabilidade do autor.

Custos - uma taxa de tramitação de R\$50,00 é devida para cada trabalho submetido para publicação e deve ser remetida juntamente com o manuscrito. Esta taxa não será cobrada dos autores das revisões.

PADRONIZAÇÕES

Abreviações não convencionais devem ser evitadas e, em caso de serem usadas, devem ser definidas na sua primeira aparição no texto. As abreviações convencionais serão tratadas nos tópicos que seguem. Quantidades, unidades e símbolos, no sistema métrico, devem seguir as normas internacionais; mantendo, sempre, um espaço entre um número e a unidade, como no exemplo 37 oC. O nome de cultivares deverá vir entre apóstrofes ou precedido pelo nome cultivar ou cv., a exemplo de 'Carioca', a cultivar Carioca ou a cv. Carioca.

Nomes científicos de organismos devem ser escritos em itálico, após o nome comum do organismo. Em sua primeira aparição no corpo principal do texto, no Resumo e no "Abstract", o nome genérico e específico será citado por extenso. As citações subseqüentes devem ser abreviadas no nível genérico (Ex. *Sclerotium rolfsii* Sacc. como *S. rolfsii*). A autoridade do nome científico de seres vivos deve ser citada no corpo principal do texto, na ocasião de sua primeira aparição. A citação será feita de acordo com as normas da nomenclatura binomial latina, de acordo com autoridades internacionais, disponíveis em páginas na internet; para plantas no *The International Plant Names Index* (<http://www.ipni.org/index.html>), e para fungos no *Index Fungorum* (<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>).

Os nomes das espécies de vírus devem seguir as normas estabelecidas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), de acordo com o Código Internacional de Classificação e Nomenclatura publicado no 8º. Relatório do ICTV (2005). Nomes de espécies são nomes científicos e, portanto, devem ser escritos em inglês, de forma análoga aos nomes científicos de plantas e outros organismos vivos, escritos em latim. Nomes científicos não são traduzidos, mas em casos nos quais o nome do vírus em português é tradicionalmente utilizado, este pode aparecer na primeira citação, acrescentando-se, entre parênteses, o nome em inglês em itálico, seguido da sigla definidos pelo ICTV. Por exemplo: vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV); vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV). A seguir, usar apenas o nome científico em inglês ou a sigla para se referir ao vírus. Os nomes científicos e suas siglas podem ser consultados no 8º. Relatório do ICTV, e no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/. Os nomes das categorias taxonômicas como ordem, família, subfamília e gênero devem ser escritos em itálico, com a primeira letra maiúscula, precedidos do termo da unidade taxonômica. Exemplos: família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*. Na primeira citação de uma espécie de vírus no texto, acrescentar o nome da família e/ou gênero. Exemplo: vírus do mosaico comum do feijoeiro (*Bean common mosaic virus*, BCMV, família *Potyviridae*,

gênero *Potyvirus*).

Peso molecular e Daltons - O uso correto do peso molecular de uma proteína é, por exemplo, 54.000. O uso correto da massa molecular da mesma proteína é 54.000 Da ou 54 kDa.

Sistema métrico - Colocar todas as unidades no sistema métrico, usando L, mL, µL.

Unidades de tempo - Quando antecedida de números, usar as unidades de tempo com as seguintes abreviações: segundos (s), minutos (min) e horas (h).

Defensivos agrícolas - Utilizar apenas nomes técnicos e/ou princípios ativos. Não é recomendável a menção de nomes comerciais de produtos ou de empresas que os produzem e que sugira sua utilização. As fórmulas químicas devem ser escritas em uma linha e obedecer à nomenclatura atualmente mais aceita."

CASOS

OMISSOS

A orientação sobre situações não previstas nestas normas será dada pela Comissão Editorial, no curso do exame de cada manuscrito submetido à publicação em **Fitopatologia Brasileira**

Tipos de trabalhos

Fitopatologia Brasileira publica trabalhos originais em formato de Artigo, Comunicação, Nota Fitopatológicas, Revisão (preparada por autores convidados) e Carta ao Editor, conforme descrito abaixo. Todos os trabalhos serão avaliados preliminarmente pela Comissão Editorial e por Editor Associado da área específica do manuscrito. Na pré-análise, o trabalho pode ser aceito para revisão ou devolvido aos autores para modificação da forma. Manuscritos aceitos para revisão serão submetidos à análise de, pelo menos, dois consultores *ad hoc*, escolhidos dentre os especialistas da área do trabalho submetido, sócios ou não da Sociedade Brasileira de Fitopatologia (SBF). A aceitação ou rejeição de um trabalho será decidida pelo Editor Associado, baseado na avaliação dos pareceres dos consultores *ad hoc* e da sua própria análise, em consonância com o Presidente da Comissão Editorial. Revisão e Carta ao Editor serão objetos de análise do Presidente da Comissão Editorial que os submeterá à análise de dois consultores, preferencialmente entre os Editores Associados.

Artigo - Relata um trabalho original completo em que a reprodutibilidade dos resultados está claramente estabelecida. É recomendado aos autores que preparem seus manuscritos considerando que eles deverão ter, aproximadamente, sete páginas impressas

(15-20 digitadas em espaço duplo), incluindo em torno de 30 referências bibliográficas, quatro figuras e/ou gráficos e quatro tabelas. Conterá: Título, nome dos autores, filiação institucional, data de aceitação, autor para correspondência, referência do trabalho, resumo, de no máximo 250 palavras, palavras-chave, citação, abstract (com título em inglês), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (fazendo referência a apoios recebidos de natureza financeira como bolsas, projetos etc. ou intelectual), Referências Bibliográficas, Tabelas e Figuras. Os itens Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos ou em separado. Não faz parte do formato de **FB** uma seção de Conclusões.

Comunicação - Relata resultados conclusivos e não dados preliminares. É um formato alternativo para descrever, de forma mais concisa, resultados parciais de um trabalho mais amplo, ou o relato de resultados conclusivos baseados em um menor volume de dados. O texto completo não terá mais que cinco páginas impressas (12-15 digitadas em espaço duplo) e não deverá ter mais que duas figuras/gráficos, uma tabela e não mais que 15 referências bibliográficas. A Comunicação conterá as informações das seções de um artigo, mas não terá os títulos Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão.

Nota Fitopatológica - Destina-se à divulgação rápida de informações como primeira constatação numa região de doença já conhecida; ensaios de defensivos; descrição de cultivares resistentes e registros importantes para a vigilância fitossanitária (quarentena). O texto e figura ou tabela deverão estar contidos em uma página impressa, duas digitadas em espaço duplo ou três, quando não tiver elementos ilustrativos como figura ou tabela. Deverá conter, além dos elementos comuns do título e do texto, um curto Abstract ou Resumo quando redigido em inglês. As referências bibliográficas devem ser incorporadas no texto, de forma reduzida, incluindo apenas o primeiro autor, veículo de publicação, volume, página inicial e ano.

Revisão - Apresentada por autores convidados para elaborar revisão sobre um assunto relevante ou em grande evidência. Sua estrutura é mais livre do que a dos outros tipos de trabalho e não tem limite definido de páginas, ilustrações e referências bibliográficas.

Carta ao e do editor - Tem como objetivo tratar, de forma menos formal, assunto técnico-científico ou de outra natureza, de interesse da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Sua publicação ficará a critério do Presidente da Comissão Editorial, ouvindo a Comissão Editorial.

Submeter um manuscrito

A Comissão Editorial solicita aos autores, que pretendem submeter um manuscrito, preparar os documentos listados a seguir. A Comissão aceita o envio da documentação por E-mail.

- Texto em três vias, digitado em espaço duplo, paginado e com numeração de linhas contínua;
- Disquete ou CD contendo o texto original e elementos gráficos como tabelas, figuras, fotografias e microfotografias em arquivos separados;
- Carta de encaminhamento com a anuência de todos os autores;
- Cheque nominal ou comprovante de depósito referente à taxa de tramitação no valor de R\$ 50,00; Conta para depósito da taxa de tramitação: SBF, Banco do Brasil, Agência 0364-6, cc. 36.981-0
-

Encaminhar para o endereço:

Fitopatologia Brasileira - Comissão Editorial

Universidade Federal de Lavras

Cx. Postal 3066

37200 000 Lavras MG

INTRUÇÕES PARA AUTORES - EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *European Journal of Plant Pathology* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://ejpp.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *European Journal of Plant Pathology* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Colour figures are free of charge. Please indicate at submission which figures should be printed in colour.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

General

No page charges are applicable, but prospective authors should condense their text as much as possible. The *European Journal of Plant Pathology* welcomes research papers, review papers and short communications. Fifty offprints will be supplied free of charge.

Research papers describing original research should address biological problems. They should contain a novel and well formulated hypothesis, a sound experimental approach, results that confirm or reject the hypothesis and should offer novel insight into the existing body of knowledge. Research papers should not exceed twenty pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approximately 600 words).

The Short communication format is intended for presentation of important observations that can be clearly described in an abbreviated format. For example, molecular data useful for typing pathogens or the first report of preliminary data would be suitable for this section. Short descriptions of genes isolated from pathogens and pest organisms, and of plant genes with a putative function in plant–pathogen interactions can also be presented in the Short communication format. Short communications should contain firm data and will be refereed. A short communication should have an abstract and should not exceed four printed pages in total. There are no subheadings and a description of Materials and methods should be integrated in the text. Authors who wish to submit a review should first contact the Editorial Office or the Editor–in–Chief, since only Mini reviews on topical issues will be considered for publication. Reviews should not exceed 12 pages of printed text, including Tables, Figures, and References.

Papers already published or in press elsewhere will not be accepted. If any part of the subject matter or experiments included in a manuscript submitted to the journal has been the subject of any prior publication, this prior publication must be identified. Papers of restricted local importance will not be accepted. Manuscripts should be written in standard English. Manuscripts should be typed clearly, double–spaced throughout on with margins of 3–5 cm. All pages (including the Tables, Figures, Legends and References) should be numbered consecutively. As a guide for acceptable style please consult recent issues of the journal and the Council of Biology Style Manual, 6th edition (1987), available from the American

Institute of Biological Sciences, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, USA. Failure to comply with these instructions will delay consideration of the manuscript.

Authors are invited to submit the names of at least four suitable referees who would be competent to provide a review of their paper; however the final choice of referees will be at the discretion of the editor. The manuscript should be arranged in the following order:

Title Page

(page 1)

the title should be brief but informative.

the Author's full name (if more than one, use 'and' before the last name and indicate to whom correspondence should be addressed).

Affiliation(s)/Address(es) should be complete, and should include a fax number and E-mail address for correspondence.

Key words/Abstract/Abbreviations

(page 2)

Key words (a maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing). Key words should differ from words mentioned in the title. Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words). No abbreviations should be used in the abstract. Abbreviations (arranged alphabetically; only those which are not familiar and/or commonly used).

Main Text

The text must be developed under the following headings:

- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion

The relative importance of headings and subheadings should be clear.

The approximate location of Figures and Tables should be indicated in the margin.

References

Authors are requested to limit the number of references listed in full scientific papers and short communications to 35. This limit may be exceeded in review articles, or at the discretion of the editor where the subject matter of a paper justifies more than the limit.

1. Journal article: Barlow, D. H. & Lehman, C. L. (1996). Advances in the psychosocial treatment of anxiety disorders. *Archives of General Psychiatry*, 53, 727-735
2. Book chapter: Cutrona, C. E. & Russell, D. (1990). Type of social support and specific stress: Towards a theory of optimum matching. (In I.G. Sarason, B. R. Sarason, & G. Pierce (Eds.), *Social support: An interactional view* (pp. 341-366). New York: Wiley.)
3. Book, authored: Capland, G. (1964). *Principles of preventive psychiatry*. (New York: Basic Books)
4. Book, edited: Felner, R. D., Jason, L. A., Moritsugu, J. N. & Farber, S. S. (Eds.) (1983). *Preventive psychology: Theory, research and practice*. (New York: Pergamon Press)
5. Paper presented at a conference: Phelan, J. C., Link, B. G., Stueve, A. & Pescosolido, B. A. (1996, November). *Have public conceptions of mental health changed in the past half century? Does it matter?* (Paper presented at the 124th Annual Meeting of the American Public Health Association, New York)
6. Patent:
Name and date of patent are optional
Norman, L. O. (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998
7. Dissertation:
Trent, J.W. (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
8. Published and In press articles with or without DOI:
 - 8.1 In press
Wilson, M., et al. (2006). References. In: Wilson, Mm (ed) *Style manual*. Springer. (Berlin Heidelberg New York: Springer) (in press)
 - 8.2. Article by DOI (with page numbers)
Slifka, M. K.& Whitton, J. L. (2000). Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine* 78,74–80. DOI 10.1007/s001090000086
 - 8.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)
Slifka, M. K. & Whitton, J, L, (2000), Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine (in press)*. DOI 10.1007/s001090000086
 - 8.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)
Slifka, M. K.& Whitton, J. L. (2000). Clinical implications of dysregulated cytokine

production. *Journal of Molecular Medicine*. DOI 10.1007/s801090000086

9. Internet publication/Online document

9.1. Internet articles based on a print source

VandenBos, G., Knapp, S., & Doe, J. (2001). Role of reference elements in the selection of resources by psychology undergraduates [Electronic version]. *Journal of Bibliographic Research*, 5, 117-123.

VandenBos, G., Knapp, S., & Doe, J. (2001). Role of reference elements in the selection of resources by psychology undergraduates. *Journal of Bibliographic Research*, 5, 117-123. Retrieved October 13, 2001, from <http://jbr.org/articles.html>

9.2. Article in an Internet-only journal

Fredrickson, B. L. (2000, March 7). Cultivating positive emotions to optimize health and well-being. *Prevention & Treatment*, 3, Article 0001a. Retrieved November 20, 2000, from <http://journals.apa.org/prevention/volume3/pre0030001a.html>

9.3. Article in an Internet-only newsletter

Glueckauf, R. L., Whitton, J., Baxter, J., Kain, J., Vogelgesang, S., Hudson, M., et al. (1998, July). Videocounseling for families of rural teens with epilepsy -- Project update. *Telehealth News*, 2(2). Retrieved from <http://www.telehealth.net/subscribe/newslett4a.html1>

9.4. Stand-alone document, no author identified, no date *GVU's 8th WWW user survey*. (n.d.). Retrieved August 8, 2000, from <http://www.cc.gatech.edu/gvu/usersurveys/survey1997-10/>.

9.5. Document available on university program or department Web site

Chou, L., McClintock, R., Moretti, F., Nix, D. H. (1993). *Technology and education: New wine in new bottles: Choosing pasts and imagining educational futures*. Retrieved August 24, 2000, from Columbia University, Institute for Learning Technologies Web site: <http://www.ilt.columbia.edu/publications/papers/newwine1.html> Other Electronic Sources

9.6. Electronic copy of a journal article, three to five authors, retrieved from database

Borman, W. C., Hanson, M. A., Oppler, S. H., Pulakos, E. D., & White, L. A. (1993). Role of early supervisory experience in supervisor performance. *Journal of Applied Psychology*, 78, 443-449. Retrieved October 23, 2000, from PsycARTICLES database

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the

journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Virus Nomenclature

ICTV approved guidelines should be used. ICTV uses italics for virus names when these are approved Species in the Genus. Examples from the potyviridae: Papaya ringspot virus (PRSV) as a Species in the Genus. Synonyms for Papaya ringspot virus, such as Watermelon mosaic virus 1 are not written in italics. Tentative Species in the Genus, i.e. Alstromeria streak virus (AlStV) are also not in italic.

Abbreviations and Units

SI units should be used, e.g: mg, g, km, m, cm, mm, ppm, cpm, Ci(Curie), l(litre), ml, s(second), min(minute), h(hour), mol, m⁻³, kg per ha or kg ha⁻¹. The minus index form is always to be used in Tables.

- Use mg l⁻¹, not mg/l.

- If a non-standard abbreviation is to be used extensively, it should be defined in full on page 2 and follow the abstract.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Do's

1. Consistency. Be absolutely consistent and check the use of punctuation, abbreviations, capitals and lower case in headings, spelling, etc. If possible, use the spelling checker on your computer.

2. Special characters. If the ASCII character set or the character set(s) of your wordprocessing package does not contain the special characters you need, key in a code between angle brackets,

3. and use this each and every time you want the character to appear. Make the code self-explanatory.

Note: Always supply us with a list of the codes that you have used!

4. Headings. Start headings etc. flush left, with two space lines above (i.e. three Hard Returns) and one space line below (two Hard Returns). Distinguish different levels of headings and be consistent.

5. Paragraphs. Indent all paragraphs with a [TAB] code, and separate them from one another with one Hard Return.

6. Block quotations should be indented with an [Indent] code and should have one space line (i.e. two Hard Returns) above and below.

7. Equations. One-line equations without fractions can be typeset from the diskette when they are keyed in as plain text. Other equations can not be used from the diskette: they will be typeset manually from the hard copy.

8. References. Strictly follow the Instructions for Authors.

Don'ts

1. Hyphenation. Do not hyphenate words at the end of a line. Use only one hyphen for words such as "well-being", and "re-do" and use two hyphens for sequences of dates and years such as "conference dates are 12-15 September, 1992", "age groups between 20-30 years are welcome", and Page number indications in References, e.g. "pp. 240-243".

2. Hard Returns. Do not use Hard Returns except when absolutely necessary, such as at the end of paragraphs, headings, etc. Otherwise, let the word wrap feature of your wordprocessor do this work for you.

3. TAB feature and Spacebar. If you need more than one space between two items, e.g. when you write in columns, always use the [TAB] feature of your wordprocessing package. Use the spacebar only for separating words from one another. Do not use the spacebar to format tables, for centering or laying out texts, or for any other form of line or page formatting.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and Access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides in alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springers online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular

subscription–model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

<http://www.springer.com/openchoice>

<http://www.springer.com/journal/10658>



<http://www.springer.com/journal/10658>

European Journal of Plant Pathology

Published in cooperation with the European Foundation for
Plant Pathology

Editor-in-Chief: B.M. Cooke

ISSN: 0929–1873 (print version)

ISSN: 1573–8469 (electronic version)

Journal no. 10658

Springer Netherlands

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Fabiana Aparecida Cavalcante
Estudo molecular e bioquímico de cultivares de algodão
em resposta a *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalos –
porivides* A. S. Costa / Fabiana Aparecida Cavalcante Silva
108 f. : il.

Orientador : Péricles de Albuquerque Melo Filho
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento
genético – Universidade Federal Rural de Pernambuco. De-
partamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 633. 51

1. Ramulose
 2. Doença
 3. Algodão
 4. Marcadores
- I. Melo Filho, Péricles de Albuquerque
II. Título