

**RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A MURCHA DE FUSÁRIO: MÉTODOS DE
OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS E INOCULAÇÃO; AVALIAÇÃO DE
GERMOPLASMAS; INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

ERICK FARIAS COUTO

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia - Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Fitopatologia.**

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

**Prof.^a Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira – Orientadora
Prof.^o Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho – Co-orientador
Dr.^o. Nelson Dias Suassuna – Co-orientador**

**RECIFE - PE
MARÇO, 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

C871r Couto, Erick Farias
Resistência de algodoeiro a murcha de fusário : métodos de
obtenção de plântulas e inoculação ; avaliação de germoplasmas ;
indução de resistência e caracterização da atividade enzimática /
Erick Farias Couto. -- 2008.
67 f. : il.

Orientadora : Sônia Maria Alves de Oliveira
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia.

CDD 580.725

1. *Fusarium oxysporum*
2. *Vasinfectum*
3. *Gossypium*
4. PR proteínas
5. Plântulas
6. Resistência
7. Indutores abióticos
8. Infecção
9. Fitopatologia
- I. Oliveira, Sônia Maria Alves de
- II. Título

**RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A MURCHA DE FUSÁRIO: MÉTODOS DE
OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS E INOCULAÇÃO; AVALIAÇÃO DE
GERMOPLASMAS; INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

ERICK FARIAS COUTO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 03 de Março de 2008.

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves de Oliveira

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Maria Menezes (UFRPE)

Prof. Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho (IPA)

Dr. Nelson Dias Suassuna (Embrapa-Algodão)

Prof.^a Dr.^a Vitorina Nerivânia Covello Rehn (UFPE)

Prof.^a Dr.^a Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

**RECIFE - PE
MARÇO, 2008**

À memória de minha avó materna
EMÍLIA PRIMO MONTEIRO
MINHA HOMENAGEM
E SAUDADE INFINITA...

A toda minha família pelo apoio e compreensão

OFEREÇO

**A minha esposa Raquel Bezerra Jatobá, pelo amor,
companheirismo e pela compreensão na interferência dos seus
planos de vida, em prol de meus projetos pessoais.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **DEUS** pai todo poderoso porque sem Ele nada é possível.

Agradeço a minha esposa **Raquel** pela paciência e amor a mim ofertados durante períodos difíceis e de impaciência.

Agradeço aos meus pais **Vital** e **Risolene** pelo estímulo a continuidade dos meus estudos.

Agradeço, especialmente a Prof^a. **Sônia Maria Alves de Oliveira**, pela calorosa acolhida a mim oferecida por ocasião de um momento difícil que atravessei durante o período necessário para conclusão do Doutorado e também sobretudo a atenção disponibilizada neste período de convivência.

Aos pesquisadores Dr. **Nelson Suassuna** e Dr. **Wirton Coutinho**, agradeço pela valorosa contribuição e orientação para a execução dos experimentos, bem como toda a equipe do laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA-Algodão.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Pós-colheita, **Rinaldo, Wagner, Roberto Luiz, Albaneyde, Leila** e **Nina**, agradeço pelo convívio harmonioso, descontraído, alegre e fraterno, que mesmo sendo breve para mim será eterno.

A Prof^a. **Maria Menezes** agradeço pela sabedoria nos ensinamentos.

Agradeço aos funcionários da Coordenação de Pós-graduação, Sra. **Darci** e Sr. **Romildo** pela presteza com que sempre fui recebido por ocasião de algum pedido realizado.

Ao Prof. **Rildo Sartori** agradeço pela valorosa orientação inicial recebida.

Se, por ocasião de lapso de memória deixei de referenciar alguém, peço perdão e agradeço desde já.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	07
ABSTRACT	08
CAPÍTULO I Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas	21
CAPÍTULO II - Métodos de Plantio e Avaliação de Germoplasmas de Algodoeiro em Relação à Murcha de Fusário	
Resumo.....	27
Abstract	28
Introdução.....	28
Material e métodos.....	30
Resultados e discussão	32
Referências bibliográficas	36
CAPÍTULO III - Avaliação de Indutores de Resistência em Algodoeiro a Murcha de Fusário: Atividade Enzimática e Índice de Infecção	
Resumo.....	42
Abstract	43
Introdução.....	43
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão	49
Referências bibliográficas	54
CONCLUSÕES GERAIS	65

RESUMO

O algodão tem acompanhado a história do homem desde tempos remotos, serve como matéria-prima para a confecção de vestuário e ainda apresenta como subprodutos uma rica fonte de proteína para o consumo de animais domésticos. Devido a sua ampla distribuição em todo o Brasil, a ocorrência de doenças tem se tornado cada vez mais freqüente. Dentre as doenças, um grande destaque é dado a murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), devido ao seu potencial em causar sérios prejuízos e seu difícil controle. Diante do exposto, o presente trabalho refere-se as atividades realizadas visando desenvolver uma alternativa para a cadeia produtiva do algodoeiro. O primeiro experimento refere-se a avaliação de métodos de plantio de algodoeiro e avaliação de 106 cultivares de algodoeiro em relação a murcha de fusário. Dentre os métodos de plantio avaliados, o plantio em copo plástico foi o escolhido por ter proporcionado um melhor desenvolvimento do sistema radicular das plântulas de algodoeiro. No método da restrição hídrica não ocorreu o aparecimento de sintomas característicos da murcha de fusário. O método do papel toalha resultou em plântulas anormais ou as sementes foram parasitadas com contaminantes. Entre as cultivares testadas quanto a reação a murcha de fusário foi possível estabelecer um grupo com um alto nível de resistência com destaque para a cultivar SP 2473-A, que também possui resistência contra a ramulose. O segundo experimento refere-se a indução de resistência com os indutores abióticos (acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e fosfato de potássio) em plântulas da cultivar BRS Cedro de algodoeiro e avaliação da atividade enzimática elicitada (amostras de folhas e caule) em plantas induzidas (com uma e duas induções) e não induzidas, inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, sendo ainda realizada a avaliação do índice de infecção. O menor índice de infecção (45,00) foi obtido pelo tratamento com metil jasmonato (duas inoculações) no caule. Neste tratamento foi possível estabelecer a provável conexão entre o menor índice de infecção e um alto nível da enzima peroxidase nas folhas e da enzima superóxido dismutase no caule.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Gossypium* spp., PR proteínas, resistência, métodos de obtenção plântulas, indutores

ABSTRACT

The cotton has been in the human history for ages; it is used to the confection of clothes and its subproducts are an important source of protein to the domestic animals. Because of its wide distribution in the Brazil, the occurrence of disease has become more frequently. Among the diseases, great importance is given to the fusarium wilt of cotton (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) because of its potential to cause severe losses and its hard control. The present work aimed to develop alternatives to be offered to the cotton producers. The first experiment refers to the evaluation of the planting methods of cotton and the reaction of 106 cultivars in relation to the vascular wilt of fusarium. Among the methods of planting, the plastic cups was chosen because in this method the roots of the seedlings can grow more vigorously. In the water restriction method there was no occurrence of typical symptoms of the vascular wilt. The paper towel method resulted in anormal seedlings or the seedlings were contaminated with parasites. It was possible to determinated a group with a high level of resistance among the cultivars tested. In this group, its important to say that the cultivar SP 2473-A also exhibit resistance to the ramulosis. The second experiment is reffered to the resistance induction with the abiotic inducers (acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e fosfato de potássio) in seedlings of the cotton cultivar 'BRS Cedro' and the evaluation of the enzymatic activity elicited (in samples of leaves and stem) in seedlings induced (once and twice) and seedlings without the induction, inoculated and not inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. The infection index was also evaluated in this treatments. The treatment with methyl jasmonate (two inoculations) in the stem showed the minor infection index (45,00). It was possible to correlate this treatment with the minor infection index and the high level of the enzyme superoxide dismutase in the stem.

Additional Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Gossypium* spp., PR proteins, methods of planting, resistance, inducers

CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO GERAL

TÍTULO: RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A MURCHA DE FUSÁRIO: MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS E INOCULAÇÃO; AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMAS; INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

INTRODUÇÃO GERAL

Algodoeiro

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas, tendo registros de uso há mais de 4.000 anos. É cultivado comercialmente em mais de 65 países, em área anual superior a 30 milhões de hectares. Essa cultura representa mundialmente mais de 40% da fibra têxtil utilizada pelo homem. Nos Estados Unidos da América 65% e no Brasil, representa mais de 60% dos insumos têxteis. Atualmente, são cultivados no mundo 4 espécies de algodoeiro: *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. herbaceum* e *G. arboreum*. O algodoeiro arbóreo (*Gossypium arboreum* L.) é de porte mediano e cultivo perene, enquanto que a espécie herbácea (*Gossypium hirsutum* L.) é um arbusto de cultivo anual também possuindo variedades perenes. Das 50 espécies classificadas, 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí, e uma do Nordeste brasileiro (*G. mustelinum*). Cerca de 90% das fibras de algodão comercializadas no mundo são provenientes da espécie *G. hirsutum* (COTTON WORLD STATISTICS, 2002).

O algodoeiro herbáceo (*G. hirsutum*) é uma planta de origem tropical e que também pode ser explorada nos países acima da latitude 30° N, sendo sensível à temperatura, portanto, noites frias ou temperaturas diurnas baixas prejudicam o seu crescimento. Possui exigência quanto a qualidade do solo, desenvolvendo-se melhor em solos férteis e ricos em matéria orgânica. Mesmo sabendo-se que o algodoeiro possui certa tolerância a seca, maior que a dos cereais, por exemplo, isso não significa que não necessite de água. Para obtenção de altas produtividades é necessária 700mm de água durante todo o ciclo da cultura. A fase vegetativa do algodoeiro inicia-se com a emergência da plântula e termina com a formação do primeiro ramo frutífero, enquanto que a fase reprodutiva inicia-se com o surgimento do primeiro botão floral e termina quando as fibras no capulho atingem o ponto de maturação para colheita. A raiz

principal é do tipo pivotante e situa-se em sua grande maioria nos primeiros 20 cm de profundidade no solo, podendo atingir, em condições ideais até 2,5 metros de profundidade. O caule é cilíndrico, ereto e às vezes pode apresentar forma ligeiramente quadrangular ou pentangular. As folhas do algodão são simples e apresentam-se como uma expansão laminar do caule. Existem no algodoeiro três tipos de folhas, as cotiledonares, que são as primeiras que surgem após a germinação, em forma de rim (reniformes), os prófilos, que são pequenas folhas que surgem na base da gema próxima à axila da folha verdadeira, e as folhas verdadeiras, lobadas e incompletas pois, não possuem bainha, subdividindo-se em dois tipos: as vegetativas, ou do ramo e as frutíferas, originadas no lado oposto de cada nó frutífero junto à estrutura reprodutiva. A flor é do tipo hermafrodita e simétrica. O fruto é em forma de cápsula, apresentando de três a cinco lóculos, cada um com seis a oito sementes. Podem apresentar formato arredondado ou alongado na ponta (ROSOLEM, 2007).

Durante a maior parte do ciclo da planta de algodão existem diversos eventos ocorrendo ao mesmo tempo, como crescimento vegetativo, aparecimento de gemas reprodutivas, florescimento, crescimento e maturação dos frutos. Cada um desses eventos é de fundamental importância para uma boa produtividade (ROSOLEM, 2007).

A expansão da cotonicultura no Brasil ocorreu em épocas distintas nas regiões do Brasil, podendo ser dividida em duas fases, uma do pioneirismo e outra moderna. A moderna cotonicultura fez-se acompanhar de mudanças estruturais na cadeia de produção e comercialização. Ocorreram elevações expressivas na produtividade agrícola, retomada das exportações, mudanças na qualidade da fibra entre outras. Percebe-se que a moderna cotonicultura foi construída em investimentos e pesquisas realizadas em anos anteriores como, por exemplo, a introdução de novas cultivares com maior adaptação ao local de produção. A resistência a fitopatógenos se destaca como um desafio a ser encarado nos próximos anos. O potencial brasileiro é grande e, de igual tamanho, são os desafios que a experimentação agrícola tem para colocar a disposição da cotonicultura nacional, cultivares que se adaptem a situação local (FERREIRA FILHO; ALVES, 2007).

Segundo dados do Ministério da Agricultura (MAPA, 2008), a produção de algodão deve ser de 3,5 milhões de toneladas em 2017/18. Segundo estudo divulgado no relatório “Projeções do Agronegócio Mundial e do Brasil”, o algodão é um dos

destaques das culturas agrícolas com desempenho positivo no país, em relação à produção, consumo e exportação. A taxa de crescimento esperada para a cultura do algodão no país, entre os anos de 2007/08 a 2017/18 segue no patamar de 4,41% ao ano, isso indica um crescimento de 53%. Para o consumo interno, a taxa anual é de 1,4%. Segundo o MAPA, o Brasil deve absorver 1,1 milhão de toneladas de algodão em 2017/18. Para as exportações, o volume projetado é de 909,5 mil toneladas. A área ocupada pela cultura do algodão expandirá para 1,76 milhão de hectares em 2016/17, e a produção aumentará para 2,21 milhões de toneladas.

Diante do cenário nacional da cultura, as enfermidades aparecem como um desafio. Devido ao cultivo em grandes áreas, aquelas que antes eram consideradas como pouco expressivas, podem vir a provocar epidemias e causar grandes prejuízos aos agricultores. A murcha de fusário do algodoeiro se destaca com grande importância, pois, foi responsável pela decadência da cultura em São Paulo na década de 50.

Murcha vascular

Independente do agente causal, as murchas vasculares possuem características sintomatológicas em comum. As folhas e brotos jovens das plantas colonizadas pelo fitopatógeno perdem a turgidez tornando-se murchos, chegando ao ponto de necrosarem e morrerem. Cortes transversais no caule evidenciam um escurecimento marrom escuro e presença de micélio e esporos, porém em pequena quantidade, não podendo estes serem responsabilizados pela obstrução dos vasos. Ao conjunto de outros fatores, como metabólitos produzidos pelo fitopatógeno pode ser atribuída a ocorrência dos sintomas. *Fusarium oxysporum* Schlecht., produz toxinas como licomarasmina e ácido fusárico, e enzimas celulolíticas e pectolíticas as quais são utilizadas para degradar a parede celular e facilitar a invasão do micélio nos tecidos do hospedeiro. As toxinas produzidas por *F. oxysporum* são carregadas pelos vasos do xilema chegando até as folhas, afetando a permeabilidade das membranas celulares e capacidade destas em controlar a perda d'água. A necrose vascular origina-se nas células do parênquima do xilema, as quais perdem coesão e liberam pigmentos dentro dos vasos devido a ação das enzimas pectolíticas, glicosidases e fenol oxidases liberadas pelo fitopatógeno (AGRIOS, 2005).

A infecção pode ser confinada pela oclusão vascular em resposta a elicitores do fitopatógeno. Esta oclusão pode ser causada pela deposição de géis de pectina e

hemicelulose ao redor do ponto de penetração do fitopatógeno ou pela formação de tiloses. No caso da murcha de fusário em algodoeiro, os géis provêm apenas uma barreira temporária ao desenvolvimento do micélio fúngico.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen é o agente causal da murcha vascular do algodoeiro, podendo afetar as plantas, em todos os estágios de desenvolvimento. O fungo forma uma teia de micélio na superfície da coifa da raiz a partir da qual as hifas de penetração se desenvolvem. Estas hifas penetram diretamente nas células epidérmicas e, subsequentemente, colonizam os tecidos intra e intercelularmente (MENDGEN et al., 1996). Em algodoeiro, no início da infecção, as folhas das plantas perdem turgescência seguindo-se o aparecimento de coloração amarelada em áreas irregulares. Realizando-se um corte em bisel no caule, percebe-se uma coloração marrom. Ao final do processo de patogênese, ocorre um murchamento geral das plantas chegando a ocorrer a morte. No Brasil, a fusariose foi assinalada pela primeira vez no ano de 1935 em material proveniente da Estação Experimental de Alagoinha no estado da Paraíba.

Resistência de germoplasmas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

A avaliação da resistência a doenças de uma espécie vegetal é de fundamental importância para um programa de melhoramento, visto que, auxilia o melhorista na escolha da fonte de resistência para a utilização em cruzamentos. Por outro lado, o conhecimento da reação de uma cultivar a uma determinada doença serve para ajudar aos melhoristas na indicação da melhor cultivar para uma determinada área ou local em particular, onde foi constatada, porventura, a presença ou ausência de um fitopatógeno específico. Dentre os objetivos de um processo de avaliação de genótipos, a rapidez e a reprodutibilidade em várias condições são aqueles que devem ser priorizados.

A resistência de uma planta pode ser caracterizada como a capacidade que esta possui em reduzir ou mesmo em evitar a atividade patogênica de determinado agente causal. Para a utilização da resistência, alguns requisitos são necessários como por exemplo, conhecimento da fonte de resistência genética, método de identificação e seleção da resistência, combinada com características agronômicas das cultivares, e variabilidade do fitopatógeno, que é essencial na estabilidade e durabilidade da resistência (LUCAS, 1998).

Rocha-Júnior et al. (1998) testaram a reação de 27 cultivares e 142 linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder e relataram que apenas as cultivares ‘Carioca M. G.’, ‘Outro Negro’, ‘Diacol Calima’, ‘CNF 05’, ‘Jalo’ e ‘Negro Argel’ apresentaram-se como resistentes.

Shepherd (1986) determinou a amplitude da resistência genética a murcha de fusário e ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) Chitwood em um grupo de 18 cultivares e linhagens de algodoeiro, concluindo que a resistência do algodoeiro a murcha de fusário pode ser desenvolvida independentemente da resistência ao nematóide. Jeffers e Roberts (1993) trabalhando com quatro genótipos de algodoeiro em relação ao complexo nematóide-fusário relatam que não houve mudança na suscetibilidade em relação ao fusário devido a presença do nematóide, porém, aquelas plantas que apresentaram uma resistência a ambos os fitopatógenos foram as que apresentaram melhor produção. A resistência a um dos fitopatógenos determina uma proteção parcial ao complexo fungo-nematóide.

Jian et al. (2003) relatam que a busca por fontes de resistência num programa de melhoramento do algodoeiro na China contribuiu significativamente para o aumento de produção e sustentabilidade da cultura. Tóffano (1963) realizou a inoculação do *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em cultivares do IAC plantadas em caixas contendo solo esterilizado com posterior retirada e corte de raízes laterais, verificou que ocorreu a morte de todas as plantas devido a violência do método de inoculação.

Cia et al. (2003) relataram o progresso no desenvolvimento de linhagens avançadas de algodoeiro (*G. hirsutum*) com resistência múltipla a cinco doenças (murcha de fusário e *Verticillium*, mancha-angular, ramulose e nematóides). Correlações positivas para resistência às doenças foram verificadas apenas para resistência a nematóides e à mancha angular. Os autores concluíram que existe a possibilidade de perda da resistência a determinada doença caso se aplique pressões excessivas de seleção para uma doença.

A resistência do algodoeiro à murcha de fusário inclui também um processo físico localizado. Em interações incompatíveis, uma rápida formação de tiloses ocorre acarretando obstrução dos vasos condutores. Quando a interação é do tipo compatível, a formação de tiloses e outros compostos é lenta permitindo ao fitopatógeno invadir e

colonizar o tecido do hospedeiro. Shi et al. (1992) relataram que a acumulação dos produtos de secreção que bloqueiam o lúmen dos vasos condutores é muito mais intensiva na cultivar de algodoeiro ‘Seabrook’, resistente ao *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em comparação com a cultivar suscetível ‘Rowden’.

Indução de resistência

A resistência a doenças de plantas está associada com a ativação de uma ampla variedade de respostas de defesa, que tem como finalidade impedir o estabelecimento de patógenos. A ocorrência de doença é devido a falha do hospedeiro no reconhecimento do patógeno, em responder rapidamente a esse sinal ou falha no mecanismo físico ou químico em prevenir a infecção (LYON; NEWTON, 1997).

A ativação de uma resposta de defesa da planta devido ao reconhecimento do patógeno é regulada por uma interação altamente específica, ou seja, ocorre a interação entre os produtos do gene de avirulência do patógeno com o produto do gene guarda da planta (DANGL; JONES, 2001). O reconhecimento específico do produto do gene de avirulência do fitopatógeno ativa um sinal de transdução em cascata que pode ser: fosforilação de proteínas; fluxo de íons; geração de espécies ativas de oxigênio entre outros. Esses sinais ativam o processo de transcrição de proteínas tais como, peroxidases, glutathione-S-transferase, proteínas da parede celular, inibidores de proteinases e enzimas hidrolíticas. A diferença entre suscetibilidade e resistência está associada à velocidade de ativação dessas mudanças bioquímicas mais do que a expressão de um conjunto de genes, pois, segundo Yi et al. (2003), a diferença entre interações incompatíveis (não ocorrência de doença) e interações compatíveis (ocorrência de doença) é quantitativa. As células que estão em contato direto com o fitopatógeno morrem num fenômeno chamado de hipersensibilidade o qual possui semelhanças com a morte programada de células em animais (TAKKEN; JOOSTEN, 2000).

Cultivares suscetíveis ou com baixo nível de resistência podem apresentar respostas de defesa através da indução de resistência, desenvolvendo mecanismos de defesas típicos de uma reação incompatível. Essa resistência refere-se a uma rota de transdução de sinal distinta, desempenhando papel importante na habilidade das plantas em se defenderem contra fitopatógenos (RYALS et al., 1996). Portanto, a rota de

transdução de sinal da resistência induzida tem a função de potencializar os mecanismos existentes de defesa: confinamento do fitopatógeno no local da infecção por meio da morte programada de células, deposição de calose, formação de espécies reativas de oxigênio, síntese de PR-proteínas como quitinase e β -1,3-glucanase, entre outras (GILCHRIST, 1998).

O termo PR proteínas se tornou um termo coletivo para todas as proteínas e suas enzimas homólogas que são produzidas após uma infecção por fitopatógeno. Estas proteínas foram primeiro descobertas em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e atualmente estão agrupadas em 17 famílias as quais estão numeradas de acordo com a ordem que foram descobertas (VAN LOON et al., 2006).

Indutores de resistência estão relacionados com a ativação dos mecanismos de resistência a invasão de fitopatógenos, dentre estes, destaca-se o ester-S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotiótico (ASM) (COLE, 1999). Os indutores atuam em diferentes pontos da rota do ácido salicílico, relacionados com os mecanismos de defesa (JAKAB et al., 2001) e indução da resistência sistêmica adquirida (RSA). ASM é um ativador em potencial da RSA em vários hospedeiros, contra um espectro de fitopatógenos, por meio da indução da produção de ácido salicílico, mesmo em plantas incapazes de produzir tal molécula, ativando assim seu sistema de defesa (GÖRLACH et al., 1996; BENHAMOU; BÉLANGER, 1998). O ASM é translocado por toda a planta ativando a transdução de sinais da RSA para locais a distância da acumulação do ácido salicílico, agindo na indução de genes que desencadeiam a produção de lignina, fitoalexinas e PR-proteínas (FRIEDRICH et al., 1996; CAVALCANTI, 2000).

Benhamou e Bélanger (1998) utilizaram o ASM para induzir resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Saccardo) Snyder & Hansen em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). Segundo estes autores, nas plantas tratadas com o indutor, o crescimento do patógeno foi restrito as células da epiderme sendo o ingresso do fungo detido pela formação de calose na parede celular.

Cavalcanti e Resende (2005) trabalhando com indução de resistência em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) suscetíveis a *Verticillium dahliae* Kleb, relataram que houve reduções de até 55,4% na severidade da doença, acréscimo da ordem de 10,5% no peso fresco e 35,7% na altura das plantas tratadas com 20 g do i.a./100 L água de ASM.

Querino et al. (2005) testaram várias dosagens de ASM e ácido β -aminobutírico (BABA) em duas cultivares de bananeira (*Musa* spp. L.) e apenas BABA (0,525 mg.mL⁻¹) reduziu a severidade da murcha de fusário.

Apesar dos sais de potássio também possuírem um potencial de indução da RSA, em um grande número de plantas contra vários fitopatógenos, os trabalhos publicados são de natureza descritiva, sendo os mecanismos envolvidos na RSA ainda parcialmente desconhecidos. A morte de células é um evento central de resposta após a aplicação de K₂HPO₄ na parte aérea, ficando esta evidente pelo aparecimento de lesões necróticas nas folhas (OROBER et al., 2002). Vários trabalhos têm demonstrado a atividade de K₂HPO₄ na indução de resistência contra fitopatógenos (REUVENI et al. 1998; MANANDHAR et al. 1998; LOPEZ; LUCAS, 2002; OROBER et al. 2002).

O papel do ácido jasmônico (JA) e do composto volátil (metil jasmonato) como moléculas de sinalamento em estresses bióticos e abióticos ou promotoras de mudanças na forma de mudanças morfológicas e fisiológicas esta bem documentado (TURNER et al., 2002; WALTERS et al., 2002; SUDHA; RAVISHANKAR, 2003; BUZI et al. 2004). Em *Arabidopsis*, a metilação do ácido jasmônico a metil jasmonato é catalisada pela S-adenosyl-L-metionina ácido jasmônico metil transferase (JMT). A expressão dessa transferase sozinha é suficiente para induzir as respostas de defesa dependentes de JA, sendo o metil jasmonato um sinal endógeno de resposta nas defesas da planta.

Adicionalmente a indutores abióticos, está bem estabelecido que uma pré-inoculação numa planta com um isolado incompatível, não patogênico ou pertencente a outra *forma speciale* de *F. oxysporum* resulta numa redução dos sintomas quando esta planta for inoculada subsequente com um isolado compatível. Dessa forma, a indução de resistência com isolados não patogênicos tem sido realizada em várias culturas (KAUR et al., 2003; ICHIKAWA et al., 2003; SILVA; BETTIOL, 2005).

Dong e Cohen (2002) utilizaram o micélio seco e o extrato aquoso de *Penicillium chrysogenum* Thom, para a indução de resistência em sementes de algodão contra *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e concluíram que o controle da doença depende da concentração e do modo de aplicação do *P. chrysogenum*, salientando, ainda, que a indução das defesas naturais da planta é o mecanismo atuante, pois, o extrato aquoso de *P. chrysogenum* não revelou atividade antifúngica a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *in vitro*.

Portanto, o processo pelo qual a resistência da planta é ativada e os eventos subsequentes a uma indução, contínuos, os compostos são sintetizados e acumulados o que contribui para a resistência (Kuc, 2001).

Mecanismos bioquímicos de resistência

As plantas desenvolveram vários mecanismos de defesas ao longo da coevolução com os microrganismos que incitam doenças. Estas defesas podem ser de duas naturezas, estrutural e química. Barreiras estruturais tem como função evitar que o patógeno obtenha nutrientes do hospedeiro. As defesas químicas podem atuar entre outros na síntese de metabólitos secundários tóxicos aos patógenos, espécies reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam para PR-proteínas. PR-proteínas são proteínas que se acumulam em resposta a um ataque de um microrganismo, tratamento com indutores de resistência ou outro tipo de estresse. Segundo Whalen (2005), as PR proteínas parecem ser a primeira linha de defesa das plantas devido a rápida ativação dos genes que as codificam. Dentre as PR-proteínas, as glucanases e quitinases possuem atividade antifúngica sinérgica (STICHER et al., 1997).

A estrutura das proteínas da família PR-1 é fortemente conservada em várias plantas chegando a 35% de homologia. Tais proteínas possuem homologia inclusive com proteínas de fungos, insetos e vertebrados (o homem inclusive) (Van Loon et al., 2006). A família PR-2 compreende as β -1,3-endoglucanases e as famílias PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 as endoquitinases, todas possuindo atividade contra fungos. As PR-7 são endoproteínases que atuam na dissolução da parede celular de vários microrganismos. A família PR-6 compreende inibidores de proteinases as quais atuam contra nematóides e insetos, enquanto que a família PR-5 tem sido associada com atividade contra oomycetos.

Após o contato do hospedeiro com o patógeno acontece uma cascata de eventos, ocorrendo rotas específicas para certos tipos de fitopatógenos. Um regulador chave na transdução da resistência sistêmica e ativador da síntese de PR-proteínas é o gene NPR1 e seus fatores de transcrição TGA1 e TGA4 (PIETERSE; VAN LOON, 2004). Este gene regula a atividade da resistência no núcleo e funciona também como intercomunicador no citoplasma entre a rota dependente do ácido jasmônico e a dependente do ácido salicílico. Além dos fatores de transcrição já citados, os fatores

WRKY70 possuem um papel na intercomunicação entre as rotas do ácido salicílico e do ácido jasmônico (DONG, 2004).

A enzima β -1,3-glucanase atua diretamente nas células fúngicas, liberando fragmentos de oligossacarídeos da parede celular e, podendo elicitar respostas secundárias de defesa das plantas (VAN LOON, 1997). Existem vários trabalhos na literatura relativos a atividade da β -1,3-glucanase em resposta a infecção por fitopatógenos, dentre eles, o realizado por Stangarlin e Pascholati (2000), com feijoeiro infectado por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, onde relataram que a atividade dessa enzima varia com a cultivar, enquanto que para o caso da infecção de *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris em feijoeiro, não houve relação entre o grau de resistência das cultivares e a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.

As peroxidases pertencem a família PR-9 as quais atuam no reforço da parede celular pela lignificação atuando contra diversos fitopatógenos. A peroxidase é encontrada em tecidos tanto de animais quanto de vegetais, catalisando a oxidação pelo peróxido de hidrogênio de alguns substratos como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis. A atividade dessa enzima pode ser regenerada após tratamento térmico sendo, portanto, conhecida por ser termoestável. Young et al. (1995) citam que em arroz (*Oryza sativa* L.) a acumulação de peroxidase no fluido apoplástico dos vasos do xilema é correlacionada com a resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings.

A lignificação da parede celular propicia uma barreira física ao avanço do fitopatógeno, impedindo que as enzimas hidrolíticas secretadas por estes dissolvam as células vegetais. A indução da lignificação tem sido relacionada como uma resposta de defesa em hospedeiros suscetíveis (STICHER et al., 1997). O movimento da água no interior da planta é realizado pelos vasos condutores do xilema cuja funcionalidade é alterada por ocasião de um stress. Sendo avaliada pelas características dos elementos de condução, dentre as quais o diâmetro hidráulico do lúmen é o principal aspecto a ser observado (ARNOLD; MAUSETH, 1999).

As quitinases hidrolizam a quitina. A quitina é definida como um polímero de N-acetil-D-glucosamina com ligações β -1,4 e é encontrada embebida numa matrix de fibras de glucana com proteínas e carboidratos. Poucos fungos são sensíveis a quitinase

isoladamente, porém muitos são sensíveis a combinação desta com a β -1,3-endoglucanase (STAHL; BISHOP, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar métodos obtenção de plântulas de algodoeiro em casa de vegetação e câmara de crescimento; testar 106 genótipos de algodoeiro em relação a murcha de fusário; avaliar os produtos acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e fosfato de potássio na indução de resistência a *F. oxysporum*, f. sp. *vasinfectum* na cultivar 'BRS Cedro' de algodoeiro e analisar a atividade das enzimas peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, superóxido dismutase e polifenoloxidase em plântulas de algodoeiro induzidas com os indutores acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e fosfato de potássio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ARNOLD, D. H.; MAUSETH, J. D. Effects of environmental factors on development of wood. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 86, n. 3, p. 367-371, 1999.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology*, Washington, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, 1998.
- BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Dydymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with Acibenzolar-S-methyl and Methyl Jasmonate but not with Salicylic acid. *Journal of Phytopathology*, Berlim, v. 152, n. 1, p. 34-42, 2004.
- CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Thebroma, por benzothiadiazole (BTH). 2000. 82 f. (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-verticillium em cacaueteiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2005.
- CIA, E.; FUZATTO, M. G.; KONDO, J. I.; GRIDI-PAPP, I. L., CHIAVEGATO, E. J.; PIZZINATTO, M. A. Desenvolvimento de resistência múltipla a doenças em linhagens avançadas de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 4, p. 420-423, 2003.
- COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. *Crop Protection*, Guildford, v. 18, n. 4, p. 267-273, 1999.
- COTTON: WORLD STATISTICS. Secretariat of the International Cotton Advisory Committee. Washington. Disponível em: <<http://www.icac.org/>>. Acesso em: 12 fev. 2008.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, London, n. 6839, v. 411, p. 826-833, 2001.

DONG, H.; COHEN, Y. Induced resistance in cotton seedlings against *Fusarium* wilt by dried biomass of *Penicillium chrysogenum* and its water extract. Phytoparasitica, Bet Dagan, v. 30, n. 1, p. 77-87, 2002.

DONG, X. NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 547-552, 2004.

FERREIRA FILHO, J. B. S.; ALVES, L. R. A. Aspectos econômicos do algodão no cerrado. In: Freire, E.C. (Ed.). Algodão no cerrado do Brasil. Brasília. ABRAPA, 2007. v. 1, p. 53-89.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M. G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J. P.; KESMANN, H.; RYALS, J. A. benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance en tobacco. The Plant Journal, Danvers, v. 10, n. 1, p. 61-70, 1996.

GILCHRIST, D. G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 36, p. 393-414, 1998.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOUE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORF, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESMANN, H.; RYALS, J. A. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activate genes expression and disease resistance in wheat. The Plant Cell, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, 1996.

ICHIKAWA, K.; KAWASAKI, S.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Induced resistance against *Fusarium* diseases of *Cymbidium* species by weakly virulent strain HPF-1 (*Fusarium* sp.). Journal of General Plant Pathology, Heidelberg, v. 69, n. 6, p. 400-405, 2003.

JAKAB, G.; COTTIER, V.; TOQUIN, V.; RIGOLI, G.; ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J. P.; MAUCH-MANI, B. β -aminobutyric acid-induced in plants. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 29-37, 2001.

JEFFERS, D. P.; ROBERTS, P. A. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-fusarium wilt disease complex of cotton. Phytopathology, St. Paul, v. 83, n. 6, p. 645-654, 1993.

JIAN, G.; MA, C.; ZHENG, C.; ZOU, Y. Advances in Cotton Breeding for Resistance to *Fusarium* and *Verticillium* Wilt in the Last Fifty Years in China. Agricultural Sciences in China, Zhonggvancum, v. 2, n. 3, p. 280-288, 2003.

KAUR, R.; SINGH, R. S.; SETHI, A. Study of induced resistance in chickpea seedlings due to non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Resistant Pest Management Newsletter, Michigan, v. 13, n. 2, p. 75-77, 2003.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 7-12, 2001.

LUCAS, J. A. Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Science, 1998. 274p.

LOPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Effects of plant activators on anthracnose disease of cashew. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 108, n. 5, p. 409-420, 2002.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? Plant Pathology, Oxford, v. 46, n. 5, p. 636-641, 1997.

MANANDHAR, H. K.; JORGENSEN, H. J. L.; MATHUR, S. B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Resistance to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. Crop Protection, Guildford, v. 17, n. 4, p. 323-329, 1998.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 34, p. 367-386, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA 2008. Projeções do Agronegócio Mundial e Brasil 2006/07 a 2017/18, AGE – Acessoria de Gestão Estratégica. Disponível em: <<http://www.agricultura.org.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2008.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanisms of phosphate-induced resistance in cucumber. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 345-353, 2002.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Npr1: the spider in the web of induced resistance signaling. Current Opinion in Plant Biology, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 456-464, 2004.

QUERINO, C. M. B.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R. S. B.; MATOS, A. P. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do Mal-do-Panamá. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 30, n. 3, p. 239-243, 2005.

REUVENI, R.; DOR, G.; REUVENI, M. Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. Crop Protection, Guildford, v. 17, n. 9, p. 703-709, 1998.

ROCHA JÚNIOR, W. C.; SANTOS, J. B.; MENDES-COSTA, M. C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 23, n. 3, p. 407-409, 1998.

ROSOLEM, C. A. Fenologia e ecofisiologia no manejo do algodoeiro. In: Freire, E.C. (Ed.). Algodão no cerrado do Brasil. Brasília. ABRAPA, 2007. v. 1, p. 649-688.

RYALS, J. A.; UKNES, H. N.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. The Plant Cell, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SHEPHERD, R. L. Cotton resistance to the root Knot-*Fusarium* wilt complex. II. Relation to root-knot resistance and its implications on breeding for resistance. Crop Science, Madison, v. 26, n. 1, p. :233-237, 1986.

SHI, J.; MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 40, n. 2, p. 133-147, 1992.

SILVA, J. C.; BETTIOL, W. Potential of Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 30, n. 4, p. 409-412, 2005.

STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. Current Opinion in Plant Biology, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 299-304, 2000.

STANGARLIN, J. R., PASCHOLATI, S. F. Atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. Current Science, Columbus, v. 85, n. 8, p. 1212-1217, 2003.

- TAKKEN, F. L. W.; JOOSTEN, M. H. A. J. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 106, n. 8, p. 699-713, 2000.
- TÓFFANO, W. B. A “fusariose” do algodoeiro e o comportamento das variedades do IAC. O Biológico, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 92-96, 1963.
- TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. The Plant Cell, Rockville, v. 14, n. 1, p. 153-164, 2002.
- VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.
- VAN LOON, L. C., REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.
- YI, T.; ZHIYI, X.; WENQIONG, C.; GLAZEBROOK, J.; BIN, H.; TONG, Z.; GUANGZHOU, Z.; FUMIAKI, K. Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. The Plant Cell, Rockville, v. 15, n. 2, p. 317-330, 2003.
- YOUNG, S. A.; GUIKEMA, J. A.; WHITE, F. F.; LEACH, J. E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Physiology, Washington, v. 107, n. 4, p. 1333-1341, 1995.
- WALTERS, D.; COWLEY, T.; MITCHELL, A. Methyljasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 53, n. 369, p. 747-756, 2002.
- WHALEN, M. C. Host defence in a developmental context. Molecular Plant Pathology, Beltsville, v. 6, n. 3, p. 347-360, 2005.

CAPÍTULO II



*Avaliação de Germoplasmas de Algodoeiro em Relação à Murcha de
Fusário: Métodos de Obtenção de Plântulas e Inoculação*

**Avaliação de Germoplasmas de Algodoeiro em Relação à Murcha de Fusário: Métodos de
Obtenção de Plântulas e Inoculação**

Erick F. Couto¹, Rildo S.B. Coelho², Nelson D. Suassuna³, Wirton M. Coutinho³ & Sônia M.A.
Oliveira¹

¹UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, e-mail:erifar@click21.com.br; ²Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, Av. Gal. San Martin 1371, CEP 50761-000, Recife, PE; ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Rua Osvaldo Cruz, 1143, CEP 58107-720, Campina Grande, PB

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Erick Farias Couto

COUTO, E.F., COELHO, R.S.B., COUTINHO, W.M., SUASSUNA, N.D. & OLIVEIRA, S.M.
A. Avaliação de Germoplasmas de Algodoeiro em Relação à Murcha de Fusário: Métodos de
Obtenção de Plântulas e Inoculação. Fitopatologia Brasileira

RESUMO

Métodos de obtenção de plântulas foram testados em três cultivares de algodoeiro, ‘BRS Cedro’, ‘Delta Opal’ e ‘IAC 24’, sendo o plantio em bandejas de isopor; plantio em papel toalha; plantio em copo plástico; e método da restrição hídrica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. O método de plantio em copo plástico foi o que proporcionou um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Testou-se também a reação de 106 cultivares de algodoeiro, pertencentes a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Algodão), quanto a resistência a murcha causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pelo método de deeping por cinco minutos em suspensão de 10⁶ conídios/mL. As plântulas foram avaliadas

no 12º dia após a inoculação. Dentre as cultivares avaliadas, constatou-se a formação de quatro grupos de acordo com a reação à murcha de fusário (resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível), podendo as cultivares incluídas no grupo das resistentes serem eleitas para o uso em programas de melhoramento do algodoeiro.

Palavras-chave adicionais: *Gossypium* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, plântulas

ABSTRACT

Methods of planting and evaluation of cotton germplasms in relation to the vascular wilt

Methods of planting were tested in three cotton cultivars, 'BRS Cedro', 'Delta Opal' and 'IAC 24'. The methods were: seeding in polystyrene isopor trays; seeding in paper towel; seeding in plastic cups and the water restriction method against *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. The planting method chosen was the seedling in plastic cups, because in this method the roots could grow more vigorously. The reaction of cotton cultivars was also tested using the dipping method for five minutes in suspension with 10^6 conidia per mL. The seedlings were evaluated 12 days after inoculation and it was possible to distinguish four groups based on their reaction to the vascular wilt. The groups were considered resistant, moderately resistant, moderately susceptible. The first group could be elected to be used in cotton breeding programs.

Additional keywords: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, planting methods, *Gossypium* spp.

INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* sp.) é a fibra têxtil natural renovável mais importante e a sexta maior fonte de óleo vegetal no mundo (Ulloa *et al.*, 2006). O gênero *Fusarium* compreende um grande número de espécies que possuem uma ampla distribuição ao redor do planeta, sendo encontradas desde o ártico até o deserto do Saara (Di Pietro *et al.*, 2003). A murcha do algodoeiro causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen foi assinalada pela primeira vez no Brasil em 1935 no estado da Paraíba (Krug, 1936 apud Suassuna & Coutinho, 2007).

F. oxysporum f. sp. *vasinfectum* é um habitante do solo que invade as raízes do algodoeiro bloqueando a passagem de nutrientes pelos vasos do xilema e ocasionando uma murcha da parte aérea com eventual morte das plantas. As perdas decorrentes da infecção por este fitopatógeno são variáveis dependentes da região e dependem principalmente do nível de infestação do solo, da resistência da cultivar e da presença de nematóides. O fungo é capaz de sobreviver por longos períodos na ausência do hospedeiro principalmente na forma de clamidósporos (Di Pietro *et al.* 2003). De acordo com Ulloa *et al.* (2006), existem oito raças de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, que são identificadas de acordo com teste de patogenicidade em diferentes espécies de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L. e *G. arboreum* L.), em plantas de soja (*Glycine max* L. (Merrill)), alfafa (*Medicago sativa* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.).

O manejo da doença é difícil, sendo apenas realizado por meio do uso de cultivares resistentes e sementes sadias. A rotação de culturas não é efetiva devido à habilidade do patógeno em sobreviver no solo por longos períodos, inclusive na ausência do hospedeiro (Davis *et al.*, 2006).

Em algodoeiro, vários pesquisadores (Shepherd, 1986; Starr *et al.*, 1989; Jeffers & Roberts 1993; Carneiro *et al.*, 2005) verificaram que os danos causados pela murcha de fusário podem ser aumentados devido a presença de nematóides no solo os quais favorecem a penetração do fungo no sistema radicular das plantas.

A resistência de uma planta pode ser caracterizada pela sua capacidade em reduzir ou mesmo em evitar o desenvolvimento de determinado fitopatógeno. Segundo Ulloa *et al.* (2006), a resistência do hospedeiro é a estratégia mais econômica e efetiva no controle da murcha de fusário do algodoeiro, porém pouco se conhece a respeito dos mecanismos envolvidos na resistência. Tomando-se como base as possíveis perdas econômicas e a inevitável disseminação a curtas e longas distâncias via semente, informações a respeito de uma possível resistência se faz necessária para um manejo da doença mais duradouro.

Após estas considerações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar métodos para obtenção de plântulas de algodoeiro para selecionar genótipos com resistência à murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, visando a elaboração de um procedimento rápido e preciso para a avaliação de cultivares de algodoeiro, e também, testar 106 cultivares quanto a resistência a murcha de fusário.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em Campina Grande-PB (Embrapa-Algodão), e no campus da UFRPE em Recife-PE. As cultivares de algodoeiro utilizadas foram: ‘BRS Cedro’; ‘Delta Opal’ e ‘IAC 24’ padrões suscetível, intermediário e resistente, respectivamente. As cultivares de algodoeiro avaliadas, totalizando 106, foram obtidas do banco ativo de germoplasma da Embrapa-Algodão.

Métodos de obtenção de plântulas para inoculação

Bandejas de isopor

Sementes das cultivares de algodoeiro foram semeadas em bandejas de isopor as quais continham vermiculita previamente esterilizada em autoclave por 1h a 120 °C, procedimento repetido três vezes, a cada intervalo de 24 horas. Em cada célula foi depositada uma semente de cada uma das cultivares e as bandejas mantidas em câmara de crescimento com controle de temperatura (25 °C). Sete dias após a semeadura, as plântulas de cada cultivar foram retiradas das células tomando-se o cuidado de evitar ferimentos, e realizado um ferimento na região da coifa com tesoura esterilizada. Em seguida, as plântulas foram imersas numa suspensão de esporos na concentração de 10^6 conídios/mL, por cinco minutos, conforme Pastor-Corrales & Abawi (1987). Ao final deste período, as plântulas foram transplantadas para copos plásticos, com capacidade de 500 mL, os quais continham 450 g de solo (textura franco-arenosa) previamente esterilizado, e mantidos em câmara de crescimento.

Papel toalha

As sementes das cultivares de algodoeiro foram acondicionadas entre folhas de papel toalha previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e mantidas em câmara de germinação, a temperatura de 25 °C, por seis dias. Após este período as plântulas foram selecionadas conforme tamanho da parte aérea e desenvolvimento do sistema radicular sendo realizados ferimentos nas raízes segundo Menezes (1972). Em seguida, as plântulas foram imersas numa suspensão de esporos (10^6 conídios/mL), por cinco minutos e, após esse procedimento, foram acondicionadas nas mesmas condições anteriormente citadas.

Copo plástico

As sementes das cultivares de algodoeiro foram plantadas em copos plásticos (capacidade de 200 mL) contendo solo esterilizado (textura franco-arenosa). Após sete dias da semeadura, as plântulas foram removidas com o auxílio de água corrente. O sistema radicular foi ferido com o auxílio de tesoura esterilizada. A inoculação, o replantio e o acondicionamento das plântulas foram realizados conforme descrito anteriormente.

Restrição hídrica

F. oxysporum f. sp. *vasinfectum* foi cultivado por sete dias em placas de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), modificado com o soluto manitol para resultar em um potencial hídrico de -1,0 MPa (Machado *et al.*, 2004). As sementes das cultivares foram depositadas dentro das placas de Petri sobre o crescimento fúngico e incubadas durante cinco dias. Ao término deste período, as sementes foram transferidas para copos plásticos (500 mL de capacidade) e mantidas em câmara de crescimento, conforme descrito anteriormente.

A avaliação dos métodos de obtenção de plântulas foi realizado 24 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um copo plástico (capacidade de 500 mL) com três plantas. As médias do percentual de plantas mortas foram submetidas à análise de variância sendo comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Avaliação de germoplasmas de algodoeiro em relação à murcha de fusário

Cultivares de algodoeiro, totalizando 106, pertencentes ao banco de germoplasma da EMBRAPA-Algodão foram avaliadas quanto a resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

O método de obtenção de plântulas foi o do copo plástico (capacidade de 200 mL) contendo solo esterilizado e a inoculação realizada através do método do deeping (Pastor-Corrales & Abawi, 1987) por cinco minutos na concentração de 10^6 conídios/mL. As plântulas, em número de três, foram mantidas em vasos (500 mL de capacidade), em condições de casa de vegetação.

O delineamento experimental foi em blocos aumentados de Federer, com 11 repetições por cultivar. As testemunhas relativas utilizadas em cada bloco foram as cultivares 'IAC 24' e 'BRS Cedro', com reação a fusariose, consideradas resistente e suscetível, respectivamente. O ensaio foi repetido duas vezes.

A severidade da doença foi avaliada no 12º dia da inoculação. Para tanto foram atribuídas notas (0 a 4) de uma escala adaptada de Huertas-González *et al.* (1999) onde: 0- plântula sem sintomas; 1- início do aparecimento de sintomas de murcha nas folhas; 2- plântulas com as folhas com sintomas de murcha; 3- todas as folhas murchas e 4- planta morta. A partir das notas foi obtido o índice de infecção (I), expresso como $I = \text{sen}^2 \omega$, para cada distribuição de frequência obtida na parcela (Amaral, 1969). Foi realizada a transformação angular $\omega = \arcsen \sqrt{I}$ para ser possível a realização da análise de variância (Czermainski, 1999). A variável ω foi calculada para se converter notas em escala de intervalo. A análise estatística foi realizada seguindo um programa desenvolvido para o delineamento em blocos aumentados (Scott & Milliken, 1993). O critério adotado para separação dos grupos formados foi o teste do *Pseudo F*, utilizando-se o procedimento Proc Cluster do software SAS System versão 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Métodos de obtenção de plântulas para inoculação

Com relação a avaliação dos métodos de obtenção de plântulas, na restrição hídrica não ocorreu o aparecimento de sintomas característicos da murcha vascular após 24 dias da

inoculação, o mesmo ocorrendo no método do papel toalha. Estes resultados encontrados estão em desacordo com os obtidos por Machado *et al.* (2004), que relataram que à medida que se aumentou o potencial hídrico do meio houve um aumento do percentual de plântulas de algodoeiro com lesões e sementes mortas. Uma hipótese que pode ser levantada seria a dificuldade do fungo obter nutrientes a partir do meio osmoticamente modificado, porém, Machado *et al.* (2004) observaram que o meio osmoticamente modificado estimulou o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, quando comparado com o meio sem a adição do soluto manitol, descartando-se portanto, esta possibilidade.

Em relação ao método do papel toalha, houve a ocorrência de diversos fungos contaminantes os quais inviabilizaram a germinação das sementes das cultivares ou a germinação resultou em plântulas anormais.

Os métodos do copo plástico e bandejas de isopor (Tabela 1) permitiram separar as cultivares mesmo sem diferença significativa. Observou-se, portanto, que a cultivar ‘BRS Cedro’ (padrão suscetível) foi aquela que apresentou o maior percentual de plantas mortas quando cultivadas em bandejas de isopor, mesmo não diferindo quando cultivada em copo plástico e das cultivares ‘Delta Opal’ e ‘IAC 24’ cultivadas em bandejas de isopor. Diante do exposto, o método escolhido para se avaliar os genótipos, em casa de vegetação, foi o do copo plástico, mesmo que o percentual de plantas mortas não diferisse significativamente do plantio em bandejas de isopor com vermiculita, pois, o método proporcionou às plantas um ambiente mais natural e, por conseqüência, uma maior quantidade de raízes e maior área de exposição ao fitopatógeno.

O sucesso em um programa de melhoramento está intimamente ligado à avaliação de um grande número de genótipos em um curto espaço de tempo e com pouco gasto de recursos. Quando a disponibilidade de sementes é um fator determinante, os melhoristas se vêem obrigados a conduzir os experimentos sem realizar o adequado número de repetições. Dessa forma, muitos melhoristas têm buscado formas de contornar tais situações. Uma dessas formas é o delineamento em blocos aumentados de Federer (Federer, 1961) o qual é uma alternativa

viável para a avaliação de um grande número de genótipos nas etapas iniciais do programa de melhoramento (Souza *et al.*, 2000).

As condições de casas de vegetação ou câmaras controladas são as mais apropriadas para se desenvolver um trabalho que vise a seleção de resistência pois, o trabalho em tais condições reduz os custos experimentais oriundos de dados perdidos devido a variabilidade de campo (Stephens, 1993; Melgar & Roy, 1994), além do fato da resistência selecionada ser mais estável e ter maior durabilidade. Somam-se aos fatores já citados, a conveniência e rapidez dos experimentos conduzidos em casa de vegetação (Wang *et al.*, 1999).

Gui-liang *et al.* (2003), verificaram que a inoculação artificial tem como vantagem o controle da quantidade de inóculo, bem como a sua distribuição uniforme. A desvantagem reside no fato de que o método favorece uma infecção mais severa do que a que ocorreria naturalmente em condições de campo.

Avaliação de germoplasmas de algodoeiro em relação à murcha de fusário

Foram distinguidos quatro grupos de genótipos com diferentes níveis de resistência: cultivares resistentes; cultivares moderadamente resistentes; cultivares moderadamente suscetíveis e cultivares suscetíveis (Tabela 2). O grupo das cultivares resistentes foi aquele com a menor quantidade de genótipos destacando-se as cultivares ‘BJ3127’ e ‘IAC 24’, padrão de resistência. A variação no índice de infecção foi de 13,01 a 23,41. O grupo dos genótipos considerados moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis alocou cultivares em que o índice de infecção variou entre 25,87 a 45,43 e de 46,76 a 59,46 respectivamente. No grupo das cultivares suscetíveis o índice de infecção variou de 61,86 a 85,94, tendo sido incluída neste grupo a cultivar ‘BRS Cedro’ tida como padrão de suscetibilidade (índice de infecção de 66,68).

Outra forma de se obter fontes de resistência à murcha de fusário é o cruzamento entre espécies diferentes de algodoeiro. McFadden *et al.* (2004) demonstraram que *Gossypium sturtianum* (L.) é uma fonte em potencial de resistência à murcha de fusário e que a resistência é expressa inclusive na presença do genoma de *G. hirsutum*. Portanto, o conhecimento do nível de resistência das cultivares melhoradas em caracteres agrônômicos, para um determinado

fitopatogênico é de fundamental importância em um programa de melhoramento visando resistência a diversas doenças dentro da cultura do algodoeiro.

Buruchara & Camacho (2000), trabalhando com 73 genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), encontraram variação quanto a resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder. Os autores alocaram cultivares resistentes com praticamente nenhuma descoloração dos vasos internos e nenhum sintoma de murcha até cultivares com amarelecimento das folhas, epinastia e murcha prematura.

Diante dos dados obtidos nesse trabalho, as cultivares incluídas no grupo das resistentes podem ser eleitas para um programa de melhoramento do algodoeiro com vistas ao desenvolvimento de resistência a outros fitopatogênos. Dentre estas merece destaque a cultivar 'SP2473-A' considerada resistente a ramulose por Morello *et al.* (2005), sendo portanto uma fonte em potencial para futuros cruzamentos.

Nenhuma cultivar dentre as analisadas deve ser descartada, pois, mesmo sabendo-se antecipadamente e, tendo sido confirmado no presente estudo, que a cultivar 'BRS Cedro' é suscetível ao *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, ela possui caracteres desejados. Possui alta produtividade (até 450@/ha), alto rendimento de fibras (41 – 42%), alta resistência e comprimento de fibras, entre outras e, em relação às doenças, apresenta alta resistência a viroses e é medianamente resistente a ramulariose e bacteriose (Freire *et al.*, 2007).

Devido a variabilidade genética que ocorre nos fungos e, especialmente, dentro do gênero *Fusarium*, a ocorrência de epidemias não deve ser um evento ignorado, pois, as mesmas podem ocorrer a qualquer tempo e local. Este fato foi recentemente relatado por Kim (2005), na Austrália, onde ocorreu a emergência de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* extremamente agressivos, causando excessivos danos à cultura e, o mais preocupante é que, tal epidemia ocorreu na ausência de nematóides. Portanto, fica evidente que se faz necessário ter conhecimento sobre o nível de resistência à murcha de fusário entre as cultivares nacionais de algodoeiro como forma estratégica de utilização da resistência genética e de prevenção contra grandes perdas em possíveis epidemias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, E. Novo índice de intensidade de infecção. Pesquisa Agropecuária Brasileira 4:1-2. 1969.
- BURUCHARA, R.A. & CAMACHO, L., Common bean reaction to *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in central Africa. Journal of Phytopathology 148:39-45. 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G., DAS NEVES, D.I., FALCÃO, R., PAES, N.S., CIA, E. & DE SÁ, M.F.G. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* Raça 3: Reprodução e histopatologia. Nematologia Brasileira 29:1-10. 2005.
- CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34:1545-1555. 1999.
- DAVIS, R.M., COLYER, P.D., ROTHROCK, C.S. & KOCHMAN, J.K. Fusarium wilt of cotton: Population diversity and implications for management. Plant Disease 90:692-703. 2006.
- DI PIETRO, A., MADRID, M.P., CARACUEL, Z. DELGADO-JARANA, J. & RONCERO, M.I.G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular Plant Pathology 4:315-325. 2003.
- FEDERER, W.T. Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. Biometrics 17:166. 1961.
- 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. pp. 267-317.
- GUI-LIANG, J., CUN, M., CHUAN-LIN, Z. & YA-FEI, Z. Advances in cotton breeding for resistance to fusarium and verticillium wilt in the last fifty years in China. Agricultural Sciences in China 2:280-288. 2003.

- HUERTAS-GONZÁLEZ, M.D., RUIZ-ROLDÁN, M.C., DI PIETRO, A. & RONCERO, M.I.G. Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:63-72. 1999.
- JEFFERS, D.P. & ROBERTS, P.A. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-fusarium wilt disease complex of cotton. *Phytopathology* 83:645-654. 1993.
- KIM, Y. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Disease* 89:366-372. 2005.
- MACHADO, J.C., OLIVEIRA, J.A., VIEIRA, M.G.G.V. & ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). *Revista Brasileira de Sementes* 26:62-67. 2004.
- McFADDEN, H., BEASLEY, D. & BRUBAKER, C.L. Assessment of *Gossypium sturtianum* and *G. australe* as potential sources of Fusarium wilt resistance to cotton. *Euphytica* 138:61-72. 2004.
- MELGAR, J. & ROY, K.W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of causal agent. *Plant Disease* 78:265-268. 1994.
- MENEZES, M. Relações entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ATK) Snyder & Hans. e diferentes hospedeiros não suscetíveis. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1972.
- MORELLO, C.L., SUASSUNA, N.D., FREIRE, E.C., COUTINHO, W.M. & MIZUBUTI, E.S.G. Fontes de resistência a ramulose em acessos de algodoeiro. V Congresso Brasileiro de algodão. 2005. (Resumo)
- PASTOR-CORRALES, MA. & ABAWI, G.S. Reactions of selected bean germ plasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease* 71:990-993. 1987.
- SCOTT, R.A. & MILLIKEN, G.A.A. SAS program for analyzing augmented randomized complete-block designs. *Crop Science* 33:865-867. 1993.

- SHEPHERD, R.L. Cotton resistance to the root Knot-*Fusarium* wilt complex. II. Relation to root-knot resistance and its implications on breeding for resistance. *Crop Science* 26:233-237. 1986.
- SOUZA, E.A., GERALDI, I.O. & RAMALHO, M.A.P. Alternativas experimentais na avaliação de famílias em programas de melhoramento genético do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:1765-1771. 2000.
- STARR, J.L., JEGER, M.J., MARTYN, R.D. & SCHILLING, K. Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on plant mortality and yield of Cotton. *Phytopathology* 79:640-646. 1989.
- STEPHENS, P.A. Relationship between field and greenhouse reactions of soybean to *Fusarium solani*. *Plant Disease* 77:163-166. 1993.
- SUASSUNA, N.D. & 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.
- ULLOA, M., HUTMACHER, R.B., DAVIS, R.M., WRIGHT, S.D., PERCY, R. & MARSH, B. Breeding for *Fusarium* wilt race 4 resistance in cotton under field and greenhouse conditions. *The Journal of Cotton Science* 10:114-127. 2006.
- WANG, B.; DALE, M.L. & KOCHMAN, J.K. Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasms for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the glasshouse. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39:967-974. 1999.

TABELA 1 - Percentual de plantas mortas da cultivares ‘BRS Cedro’, ‘Delta Opal’ e ‘IAC 24’ inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nos métodos bandeja de isopor contendo vermiculita e copo plástico contendo solo esterilizado

Método	% Plantas mortas
Bandejas isopor Cultivar BRS Cedro	22,32a*
Copo plástico Cultivar BRS Cedro	19,74ab
Bandejas isopor Cultivar Delta Opal	19,38ab
Bandejas isopor Cultivar IAC 24	18,95ab
Copo plástico Cultivar Delta Opal	17,15b
Copo plástico Cultivar IAC 24	16,92b

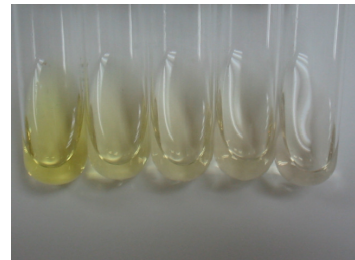
*Média de 15 repetições por tratamento; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ‘BRS Cedro’ = padrão suscetível; ‘Delta Opal’ = padrão intermediário; ‘IAC 24’ = padrão resistente.

TABELA 2 – Reação a murcha de fusário e índice de infecção dos genótipos de algodoeiro do banco ativo de germoplasma da Embrapa-Algodão.

Genótipo	*I	Reação	Genótipo	*I	Reação	Genótipo	*I	Reação
BJ 3127	13,01	R	CAB CS	39,98	MR	84-2	53,02	MS
IAC 24	13,61	R	La Frego	40,16	MR	Bayon SN-1	53,17	MS
CNPA 2N	16,19	R	Lambcht GL 5	40,19	MR	OC 94-55	53,82	MS
Acala 1.13-3-1	17,51	R	CNPA 94-101	40,29	MR	HS 200	53,95	MS
NWR-1	19,92	R	149	40,29	MR	Deltapine 7126	54,62	MS
CNPA 97-45	20,06	R	TB 41	40,46	MR	Acala SJ 4	54,90	MS
PHD 96	20,57	R	HR 21T	40,68	MR	83-5	55,10	MS
SP 2473-A	22,05	R	C 1211	40,69	MR	MC Nair TH 149-20	55,60	MS
Suregrow 404	22,89	R	PH 173-90	41,00	MR	90-241	55,97	MS
T 277-2-6	22,95	R	89-E-51	41,79	MR	Stoneville 132	56,08	MS
IAC 18	23,41	R	CNPA TB-15	41,80	MR	91 D-215	56,38	MS
Tancot Spinks	25,87	MR	CNPA 316-91	41,90	MR	Coker 312	57,72	MS
DPL 50	26,72	MR	BJ 3135	41,92	MR	CX 349	57,78	MS
CNPA 97-78	26,84	MR	2001	42,33	MR	Acala SJ 3	58,22	MS
90J-57	27,74	MR	CNPA 96-15	42,58	MR	CNPA 94-145	58,25	MS
CNPA 97-21	27,76	MR	V3	42,69	MR	Hancor	59,46	MS
CNPA 77-48	28,24	MR	CNPA 97-04	43,48	MR	Hybee 100A	61,86	S
Ultra precoce	28,39	MR	Epamig 4	43,91	MR	J.Brebia 830	62,60	S
2109NTH 149.20	29,77	MR	Coker 304	44,62	MR	1014	63,24	S
88G-104	30,61	MR	DES 67-132	45,43	MR	Stoneville T1001-6	63,87	S
Deltapine 16	30,64	MR	IAC RM4SM5	46,76	MS	MC Nair 220	64,26	S
CNPA 96-39	30,96	MR	Coker Carquin	46,95	MS	SPC 64	64,27	S
Parrot	31,54	MR	Hartsville	47,23	MS	149 F URSS	65,05	S
Acala Shafter	31,95	MR	Anton 99	47,51	MS	CRP-300	65,19	S
01 D-92	32,57	MR	CNPA 96-121	47,69	MS	BRS Cedro	66,68	S
CNPA 97-82	33,01	MR	SU0450	47,92	MS	Gund Okra Leave	67,17	S
CNPA TB-90	33,02	MR	CNPA TB-91	48,94	MS	Stoneville 199	69,08	S
Parrot 427	33,17	MR	OC 92-138	49,12	MS	86-2	69,11	S
2115 Plaines	34,36	MR	Suregrow 501	49,29	MS	Deltapine 7143-N	69,73	S
Gregg 35W	34,90	MR	IAC 22	49,51	MS	90 C-198	69,89	S
Stoneville 132 R	35,74	MR	T 295	51,09	MS	Chembred CBX 466	70,90	S
Stoneville Cluster	36,56	MR	CNPA 300/91	51,14	MS	Coker 307-7	71,19	S
Cacique	37,31	MR	MNH 49	51,28	MS	CNPA 96-40	72,46	S
CNPA 97-88	37,83	MR	Dixie King Parent	52,63	MS	93 84159 (SBE)	72,88	S
S 295	38,33	MR	HL-1	52,98	MS	Pora Inta	85,94	S
CNPA 88-250	39,55	MR						

*I = Índice de Infecção; R = Resistente; MR = Moderadamente Resistente; MS = Moderadamente Suscetível; S = Suscetível.

CAPÍTULO III



*Avaliação de Indutores de Resistência em Algodoeiro a Murcha
de Fusário: Atividade Enzimática e Índice de Infecção*

Avaliação de Indutores de Resistência em Algodoeiro à Murcha de Fusário: Atividade Enzimática e Índice de Infecção

Erick F. Couto¹, Rildo S.B. Coelho², Nelson D. Suassuna³, Sônia M.A. Oliveira¹

¹UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, e-mail:erifar@click21.com.br; ²Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, Av. Gal. San Martin 1371, CEP 50761-000, Recife, PE; ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Rua Osvaldo Cruz, 1143, CEP 58107-720, Campina Grande, PB

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Erick Farias Couto

COUTO, E.F., COELHO, R.S.B., SUASSUNA, N.D. & OLIVEIRA, S.M.A. Avaliação de indutores de resistência em algodoeiro à murcha de fusário: atividade enzimática e índice de infecção. *Fitopatologia Brasileira*.

RESUMO

Os indutores de resistência, acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e K₂HPO₄ (fosfato de potássio), nas concentrações de 0,2 g/L, 0,1 mL/L e 0,1 M, respectivamente, foram testados em plântulas de algodoeiro da cv. ‘BRS Cedro’, padrão de suscetibilidade, para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Foram realizadas uma e duas induções em plântulas com e sem inoculação do fitopatógeno. Amostras de folhas e caule foram avaliadas quantitativamente para as enzimas β-1,3-glucanase, peroxidase, quitinase, polifenoloxidase e superóxido dismutase. As plantas testemunhas sem inoculação apresentaram as maiores atividades das enzimas peroxidase e β-1,3-glucanase no caule. Nas folhas, a atividade das enzimas peroxidase, quitinase e superóxido dismutase foram as maiores no tratamento metil jasmonato (uma indução com inoculação). Nas amostras de folhas, não houve atividade detectada da enzima polifenoloxidase, e no caule, além desta, também não houve atividade da enzima quitinase. Constatou-se que o menor índice de infecção foi obtido no tratamento metil jasmonato com duas induções.

Palavras-chave adicionais: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, PR proteínas, elicitores

ABSTRACT

Evaluation of induced resistance in cotton to *Fusarium* wilt: enzymatic activity elicited and disease index

The inducers of resistance acibenzolar-S-metil, methyl jasmonate and K₂HPO₄ (potassium phosphate), at 0,2 g/L, 0,1 mL/L and 0,1 M respectively were tested in cotton seedlings cv. 'BRS Cedro' susceptibility pattern for controlling *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. There were tested one and two inductions in the seedlings with or without the pathogen. Samples of leaves and stem were quantitatively evaluated for β-1,3-glucanase, peroxidase, chitinase, polyphenoloxidase and superoxide dismutase. The controls without the pathogen inoculation showed the higher activity of the enzymes peroxidase and β-1,3-glucanase in the stem. In the leaves, the activity of peroxidase, chitinase and superoxide dismutase were highest in the methyl jasmonate (one induction with inoculation) treatment. There was no polyphenoloxidase activity in the leaves and stem and no chitinase activity in the stem also. The treatment with methyl jasmonate (two inductions) showed the lowest disease index.

Additional keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, elicitors, PR proteins

INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é atualmente uma das culturas anuais mais importantes para o Brasil, tanto como “commoditie” quanto pelo seu valor social. Bactérias, fungos, vírus e nematóides causam diversas doenças nos algodoeiros nas mais variadas regiões do Brasil. Dentre estas, a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans destaca-se como uma das mais importantes. O manejo da doença é realizado principalmente pela exclusão, utilizando-se sementes livres do fitopatógeno. Outras táticas importantes são rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes. Em relação ao desenvolvimento de cultivares resistentes, muitas vezes o processo é demorado e características indesejáveis podem ser incorporadas junto com caracteres desejados (Quirino & Bent, 2003).

As plantas, ao longo da co-evolução com os microrganismos que incitam enfermidades, desenvolveram mecanismos de defesas, os mais variados possíveis. Tais mecanismos podem existir tanto antes quanto após o contato com o fitopatógeno. Durante esta interação fitopatógeno-hospedeiro, ocorre uma série de eventos bioquímicos que levam a ativação de defesas por parte da planta, resultando na produção de compostos que podem ser tóxicos ao fitopatógeno ou apenas restringir o desenvolvimento. A resposta da planta pode ser verificada por mudanças bioquímicas nas células. Durante um processo infeccioso ocorre o acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese (PR proteínas) tais como glucanases, peroxidases e quitinases; produção de fitoalexinas e modificações na parede celular como deposição de caloses e lignificação (Wróbel-Kwiatkowska *et al.*, 2004).

Dentre as PR proteínas, merecem destaque as famílias 2, 3, 4 e 9. A família PR-2 compreende as β -1,3-endoglucanases e as famílias PR-3 e PR-4 as endoquitinases, todas possuindo atividade contra fungos. As peroxidases pertencem à família PR-9 as quais atuam no reforço da parede celular através da sua lignificação atuando contra diversos fitopatógenos (Van Loon *et al.*, 2006).

Uma das estratégias de controle de doenças do algodoeiro é a utilização da indução de resistência, a qual é definida como um fenômeno onde a resistência a um agente patogênico é sistemicamente induzida por uma infecção localizada ou tratamento com produtos microbianos e compostos orgânicos ou inorgânicos de natureza estrutural não relacionada (Kuc, 2001).

Vários autores têm estudado o efeito de indutores de resistência em plantas como (Ziadi *et al.*, 2001; Baysal *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2006). O indutor acibenzolar-S-metil (ASM) atua como um sinal sintético num ponto do metabolismo além do ponto que é ativado por sinais endógenos, promovendo assim a acumulação do ácido salicílico (AS) (Dann & Deverall, 2000), a qual pode ocorrer independente do AS, com o acúmulo tanto do ácido jasmônico (JA) quanto do etileno (ET) (Whalen, 2005). Dessa forma, a indução de defesas pode ser caracterizada como uma teia de transmissão de sinais interconectada, com intercruzamentos e sobreposições em que

AS, JA e ET, juntos com outros hormônios, como os brassinosteróides e ácido abscísico por exemplo, atuam como sinalizadores (Pieterse & Van Loon, 2004).

Em cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis e Shoem, β -1,3-glucanase é acumulada em pontos próximos as células fúngicas, porém, em cultivares resistentes, tecidos não invadidos também possuem acúmulo desta enzima. Segundo Benhamou *et al.* (1989), esta acumulação espacial de PR-proteínas tem papel importante na resistência.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os produtos acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e fosfato de potássio na indução de resistência contra *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, na cv. 'BRS Cedro' de algodoeiro, bem como avaliar a produção das enzimas β -1,3-glucanase, peroxidase, quitinase, polifenoloxidase e superóxido dismutase, em amostras de folhas e caule.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito dos indutores de resistência em plântulas de algodoeiro

Os indutores utilizados foram acibenzolar-S-metil (ASM), metil jasmonato (MeJ) e K_2HPO_4 (fosfato de potássio), nas concentrações de 0,2 g/L, 0,1 mL/L e 0,1 M, respectivamente, conforme indicação do fabricante.

Sementes da cultivar 'BRS Cedro', padrão de suscetibilidade, foram semeadas em copo plástico (capacidade de 200 mL), contendo solo previamente esterilizado. Quinze dias após o plantio foi realizada a primeira aplicação dos indutores através da pulverização com o auxílio de atomizador até o ponto de escorrimento. A inoculação foi realizada 21 dias após o plantio, através do método do deeping (Pastor-Corrales & Abawi, 1987), por cinco minutos, utilizando uma suspensão de 10^6 conídios/mL de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* transferindo-se posteriormente as plântulas para vaso plástico (capacidade de 500 mL) contendo solo esterilizado. Após cinco dias da inoculação, realizou-se uma segunda indução. Para todos os indutores plântulas foram induzidas uma e duas vezes, com e sem inoculação do fungo. Foram

incluídas duas testemunhas, com e sem inoculação do fitopatógeno. A unidade experimental foi composta de um vaso com três plantas e 10 repetições.

A severidade da doença foi avaliada 45 dias após a inoculação. Para tanto foram atribuídas notas (0 a 4) de uma escala adaptada de Huertas-González *et al.* (1999), sendo 0- plântulas sem sintomas; 1- início do aparecimento de sintomas de murcha nas folhas; 2- plântulas com as folhas com sintomas de murcha; 3- todas as folhas murchas; e 4- planta morta. A partir das notas foi obtido o índice de infecção (I), expresso como $I = \text{sen}^2 \omega$, para cada distribuição de frequência obtida na parcela (Amaral, 1969). Foi realizada a transformação angular $\omega = \text{arcsen} \sqrt{I}$ para ser possível realizar a análise de variância (Czermainski, 1999). A variável ω foi calculada para se converter notas em escala de intervalo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as médias foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Determinação das atividades bioquímicas

Preparo do extrato vegetal

As amostras de folhas e caule foram coletadas dois dias após a segunda indução, sendo estas congeladas imediatamente com o auxílio de nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -24 °C. O preparo do extrato bruto enzimático foi realizado imediatamente após a coleta das amostras. Para o preparo do extrato bruto enzimático, amostras de 1,5 g de folhas ou de caule, correspondentes a cada tratamento, foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido adicionando-se 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 4,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0), contendo 1 mM de EDTA. As amostras foram congeladas em freezer -20 °C durante 12 horas e, após este período, centrifugadas a 14000 rpm por 25 minutos (4 °C), transferindo-se o sobrenadante para novos tubos de eppendorfs ao final, armazenando-os a -80 °C.

β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6) (Giri *et al.*, 1998)

Para um tubo de ensaio rosqueável, foram pipetados 5,0 μ L do extrato enzimático, sendo adicionados 5,0 μ L do tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0) e 5,0 μ L de laminarina (4,0 mg/mL). Os ensaios em branco foram realizados adicionando-se 5,0 μ L de água destilada

no lugar da laminarina, em número de três repetições analíticas, para cada repetição dos tratamentos. A mistura de reação foi incubada a 40 °C por uma hora. A determinação da atividade da β -1,3-glicanase foi realizada através da quantificação colorimétrica da glicose liberada a partir da hidrólise da laminarina. Esta quantificação foi realizada mediante o uso da hidrazida do ácido p -hidroxibenzóico (HAPHB) (Lever, 1972). Para tanto, acrescentou-se 4,0 mL de uma solução de HAPHB (0,5 g HAPHB dissolvido em 10,0 mL de HCL 0,5 M, adicionando-se posteriormente 40,0 mL de NaOH 0,5 M) à mistura de reação. A solução contendo a mistura de reação juntamente com o HAPHB foi imersa em banho-maria, o qual estava preenchido com água a aproximadamente 100 °C. A solução permaneceu no banho-maria durante cinco minutos, sendo, posteriormente, resfriada em banho de gelo. O valor da absorbância das amostras foi determinado em espectrofotômetro regulado para realizar leituras no comprimento de onda de 610 nm. Os resultados foram confrontados com curva padrão composta por concentrações conhecidas de glicose (mg/L). Para cada repetição dos tratamentos, foram realizadas três repetições analíticas. Os resultados foram expressos em mg de glicose/mg de proteína.

Peroxidase (EC 1.11.1.7) (Dann & Deverall, 2000)

Em um tubo de espectrofotômetro, foram acrescentados seguindo-se esta ordem: 25 μ L de guaiacol (0,02 M); 1,0 mL do tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0); 250 μ L de peróxido de hidrogênio (0,38 M). A mistura foi agitada e serviu como ponto zero no espectrofotômetro. Após a realização deste procedimento, 25 μ L do extrato enzimático foram adicionados a mistura e rapidamente realizou-se uma leve agitação, seguindo-se da colocação do tubo no espectrofotômetro. A primeira leitura após a adição do extrato e a leitura após dois minutos de reação foram registradas.

A determinação da atividade da peroxidase foi realizada, portanto, medindo-se, a variação da absorbância após dois minutos de reação, no comprimento de onda de 470 nm, do tetraguaiacol formado pela ação da reação enzimática. Para cada repetição dos tratamentos, realizaram-se três repetições analíticas. Uma unidade de atividade (U/mL) foi definida como a

quantidade de enzima que causou o aumento de 0,001 unidade de absorvância por mL da mistura, nas condições supracitadas. Os resultados foram expressos em atividade específica (U/mg proteína), a qual é calculada dividindo-se a unidade de atividade (U/mL) pelo teor de proteína (mg proteína/mL).

Quitinase (EC 3.2.1.14) (Dann & Deverall, 2000)

A atividade da quitinase foi realizada mediante a adição, em um tubo de ensaio rosqueável de: 200 µL do extrato protéico; 600 µL do tampão acetato de sódio (0,1 M/pH 5.0); e 200 µL de CM-Chitin-RBV (2,0 mg/mL), fornecido pela Loewe Biochemica GmbH. A mistura foi incubada por 20 minutos a 40 °C, sendo paralisada com 200 µL de HCL 1,0 M. Amostras em branco foram realizadas mediante o preparo de igual mistura de cada repetição dos tratamentos, com a exceção do período de incubação a 40 °C. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 5000g (4°C), coletando-se o sobrenadante. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no comprimento de onda de 550 nm. Três repetições analíticas de cada repetição dos tratamentos foram realizadas. Os resultados foram expressos em unidade enzimática (UE)/mg proteína, onde 1 UE equivale a leitura de absorvância a 550nm/mL/minuto de incubação.

Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) (Kuzniak *et al.*, 1999)

Na determinação da enzima superóxido dismutase, 50 mM do tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0) foram adicionados a um tubo de ensaio rosqueável junto com 13 mM de L-metionina, 75,0 µL de NBT, 0,1 mM de EDTA, 2,0 µM de riboflavina e 0,1 mL do extrato enzimático. A riboflavina foi adicionada por último. A reação foi iniciada após a colocação dos tubos de ensaio sob duas lâmpadas fluorescentes de 15 W cada. Após 15 minutos de reação, os tubos foram retirados da fonte luminosa para que a reação fosse finalizada. Tubos não iluminados serviram como branco. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 560 nm em espectrofotômetro. Três repetições analíticas de cada repetição dos tratamentos foram realizadas. Os resultados foram expressos em unidade enzimática (UE)/mg proteína, onde 1 UE equivale a leitura de absorvância a 560nm/mL/minuto de incubação.

Polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) (Campos *et al.*, 2004)

Para se determinar a atividade da polifenoloxidase, colocou-se em um tubo gelado, 3,6 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5,0), 1,0 mL do extrato enzimático e 0,1 mL de catecol 0,1 M. Esta mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos e, posteriormente, incubada em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos. Após o período de incubação, a mistura foi transferida para banho de gelo adicionado-se 0,2 mL de ácido perclórico a 1,4% e uma nova agitação em vórtex foi realizada, sendo a mistura colocada em repouso. O controle em branco foi realizado substituindo-se o catecol por água destilada esterilizada. A absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda de 395 nm. Os resultados foram expressos em unidade enzimática (UE)/mg de proteína, onde 1 UE foi definida como a quantidade de enzima que causou um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto, por mL de reação. Três repetições analíticas de cada repetição dos tratamentos foram realizadas.

Proteína solúvel

O teor de proteína solúvel foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Para cada extrato em separado, 100 µL foram pipetados em um tubo de ensaio rosqueável. Ao tubo de ensaio foram acrescentados 4,0 mL do reagente “azul brilhante de coomassie” (CBB), sendo a mistura levemente agitada. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para cada repetição dos tratamentos foram realizadas três repetições analíticas. O teor de proteína solúvel de cada tratamento foi estimado através da comparação das leituras dos tratamentos com curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), de concentrações conhecidas em mg/mL.

Os testes bioquímicos foram realizados com material retirado das folhas e do caule, coletados após dois dias da segunda indução. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, e a unidade experimental foi constituída por um vaso com três plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos indutores de resistência sobre a atividade enzimática em caule de plântulas de algodoeiro

As plantas testemunhas não inoculadas foram aquelas que demonstraram os maiores índices para as enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase (Figura 1), diferindo significativamente das demais. Este resultado está em discordância daqueles reportados por Soares *et al.* (2004) que obtiveram maior atividade da peroxidase em tratamentos pulverizados com ASM comparado com os não pulverizados. Pelt-Heerschap & Bakker (1999) encontraram resultados contrários aos obtidos para a enzima β -1,3-glucanase, ocorrendo diferenças entre os tratamentos e a testemunha. Para a atividade da β -1,3-glucanase em relação aos demais tratamentos utilizados não houve diferenças significativas, sendo os tratamentos agrupados em um único bloco. Em contrapartida, ocorreram diferenças significativas na atividade da peroxidase entre os demais tratamentos.

O tratamento com ASM (duas induções com inoculação) apresentou a segunda maior atividade da enzima peroxidase, diferindo significativamente dos demais indutores e testemunha (sem inoculação). Ao que parece, a inoculação com o fitopatógeno não interferiu na expressão dos genes relacionados com a produção das enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase com exceção apenas do tratamento ASM (duas aplicações), no qual foi constatado um aumento por ocasião da inoculação. Ao contrário dos dados aqui apresentados, Liljeroth *et al.* (2001) relataram que a diminuição da produção das PR proteínas durante a patogênese pode estar relacionada a atuação do fitopatógeno o qual promove uma inativação destas enzimas.

Na atividade da superóxido dismutase, o tratamento MeJ (uma indução sem inoculação) apresentou o maior nível enzimático porém não diferiu significativamente dos tratamentos K_2HPO_4 (uma indução com inoculação) e MeJ (duas induções com inoculação). Quando se comparam os tratamentos inoculados e não inoculados percebe-se resultado inverso ao que ocorreu com as enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase, ou seja, a inoculação com o fitopatógeno interferiu na quantidade da enzima produzida, ocorrendo em alguns tratamentos um aumento do nível enzimático e diminuição em outros.

Em relação à atividade enzimática da quitinase e polifenoloxidase, não houve atividade detectada pela metodologia empregada nas amostras do caule de plântulas de algodoeiro.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, existe a possibilidade de que a expressão das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase seja constitutiva, explicando o fato de que seus níveis na testemunha não inoculada foram mais elevados e que o *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* interferiu na expressão destas enzimas.

Efeito dos indutores de resistência sobre a atividade enzimática em folhas de plântulas de algodoeiro

Para todos os indutores, a atividade da enzima β -1,3-glucanase nas folhas foi, de um modo geral, oito vezes inferior aos níveis no caule. Ao contrário do que ocorreu com a β -1,3-glucanase, os níveis da peroxidase e superóxido dismutase foram semelhantes nas amostras de folha e caule (Figura 2). Em desacordo com os dados aqui apresentados, Soares *et al.* (2004) encontraram uma maior atividade da peroxidase em amostras de folha do que em amostras de caule de feijoeiro, podendo este fato estar relacionado a maior eficiência do ASM na indução de resistência à fitopatógenos que colonizam a parte aérea.

Apesar do tratamento K_2HPO_4 (duas induções com inoculação) ter apresentado o maior nível de β -1,3-glucanase, este não diferiu significativamente dos tratamentos K_2HPO_4 (uma indução, sem inoculação), ASM (duas induções, sem inoculação), ASM (duas induções, com inoculação) e testemunha (sem inoculação), mostrando que a inoculação com o fitopatógeno não teve influência sobre a expressão desta enzima.

O tratamento MeJ (uma indução, com inoculação) apresentou os maiores níveis das enzimas peroxidase, quitinase e superóxido dismutase, porém, para a enzima quitinase não houve diferença significativa com o tratamento MeJ (uma indução, sem inoculação) e para a enzima superóxido dismutase nos tratamentos ASM (duas induções, com inoculação), MeJ (duas induções, com inoculação) e MeJ (um indução sem inoculação). Quando por ocasião da segunda indução, de modo geral houve um decréscimo na atividade da peroxidase tanto nas plantas inoculadas quanto nas não inoculadas, isto leva a crer que uma superativação das

defesas mediadas pela rota do jasmonato tem como característica uma auto inibição. Estes mesmos resultados podem ser observados para os tratamentos com MeJ em relação as enzimas superóxido dismutase e quitinase. Pelt-Heerschap & Bakker (1999) citam que a expressão da peroxidase está mais relacionada com injúrias físicas do que com a atividade patogênica.

A atividade da quitinase, com exceção do tratamento MeJ (uma indução sem inoculação), não diferiu significativamente entre os demais tratamentos. Pelt-Heerschap & Baker (1999) encontraram atividade similar da enzima quitinase dos tratamentos com a testemunha sugerindo que a expressão da quitinase é constitutiva. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem o contrário, ou seja, na interação algodoeiro x *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a expressão da enzima quitinase é favorecida pelos tratamentos com MeJ.

Não houve atividade da enzima polifenoloxidase em nenhum dos tratamentos.

Fica evidente que houve uma variação na atividade enzimática entre os tratamentos inoculados e não inoculados e entre amostras de folhas e caule, demonstrando que as enzimas são expressas diferentemente nos vários tecidos das plântulas do algodoeiro.

Efeito dos indutores de resistência sobre a atividade enzimática e índice de infecção da murcha do algodoeiro

No tratamento testemunha obteve-se o índice de infecção (68,05) diferindo significativamente dos demais. Os tratamentos MeJ (uma indução), ASM (duas induções) e K_2HPO_4 (uma indução) não diferiram significativamente, apresentando os índices de 63,49, 61,89 e 60,78, respectivamente. Os tratamentos K_2HPO_4 (duas induções) e ASM (uma indução) foram agrupados juntos tendo seus índices de infecção de 50,89 e 49,61, respectivamente.

Em relação a atividade das enzimas avaliadas no presente trabalho e relação com o índice de infecção na cultivar 'BRS Cedro', verifica-se que a alta expressão da enzima superóxido dismutase no caule (Figura 3) aliada com uma alta quantidade da peroxidase na folha (Figura 4), ambas no tratamento MeJ (duas induções), podem estar relacionadas com a redução do índice de infecção. Folhas de tomateiro tratadas com uma toxina purificada a partir

de *Fusarium* revelaram um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (Kuzniak *et al.*, 1999).

O sistema imune das plantas é responsável pela resistência às doenças por meio do reconhecimento direto ou indireto das proteínas ou outros compostos que são secretados pelos fitopatógenos. Segundo Rep *et al.* (2004), o gene de resistência I-2 de tomateiro é especificamente expresso no tecido que circunda os vasos do xilema, sugerindo que a resistência a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen é principalmente mediada pelo contato com as células do xilema que interagem com as proteínas fúngicas que são secretadas na seiva do xilema.

O tratamento ASM (duas induções) apresentou os maiores índices das enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase no caule, porém, este fato não foi capaz de reduzir a severidade da murcha. Nas folhas (Figura 4), os tratamentos com ASM, tanto uma quanto duas induções, apresentaram valores semelhantes em todas as enzimas, porém, com apenas uma indução o índice de infecção foi inferior. Este fato leva a crer que houve um gasto metabólico nas plântulas de algodoeiro refletindo nas suas defesas uma vez que ASM é um potente ativador de respostas de resistência nas plantas. Como β -1,3-glucana e quitina são os maiores constituintes da parede celular de muitos fungos, era de se esperar portanto, que a resistência sistêmica estivesse relacionada com a expressão das hidrolases correspondentes.

A atividade da peroxidase a partir da indução de resistência advém de uma seqüência de ativação de sinais que culmina com a biossíntese da lignina, a qual serve como barreira ao fitopatógeno ou interage com a quitina da parede celular dos fungos. A atividade da peroxidase em folhas induzidas com MeJ (uma indução) e ASM (duas induções) no caule foram superiores aos demais tratamentos, tendo o índice de infecção, em ambos os casos (63,49 e 61,89), não diferido significativamente.

A rápida geração e acúmulo de espécies ativas de oxigênio, que é desencadeada pela explosão oxidativa após a percepção da presença das proteínas do fitopatógeno, atuam como primeira linha de defesa. O H_2O_2 , por exemplo, possui um efeito antifúngico e antibacteriano. A

enzima superóxido dismutase é a catalisadora da dismutação do O_2^- e HO_2^+ gerando assim H_2O_2 (Resende *et al.*, 2003). No presente trabalho, o menor índice de infecção (45,00) apresentou um alto nível da enzima superóxido dismutase no tratamento com MeJ (duas induções) no caule.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, E. Novo índice de intensidade de infecção. Pesquisa Agropecuária Brasileira 4:1-2. 1969.

BAYSAL, O., SOYLU, E.M. & SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747-753. 2003.

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

BENHAMOU, N., GRENIER, J., ASSELIN, A., LEGRAND, M. Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. The Plant Cell 1:1209-1221. 1989.

CAMPOS, A.D., FERREIRA, A.G., HAMPE, M.M.V., ANTUNES, I.F., BRANCÃO, N., SILVEIRA, E.P., OSORIO, V.A. & AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39:637-643. 2004.

CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34:1545-1555. 1999.

DANN, E. K. & DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. Plant Pathology 49:324-332. 2000.

GIRI, A.P., HARSULKAR, A.M., PATANKAR, A.G., GUPTA, V.S., SAINANI, M.N., DESHPANDE, V.V. & RANJEKAR, P.K. Association of induction of protease and chitinase in

chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Plant Pathology 47: 693-699. 1998.

HUERTAS-GONZÁLEZ, M.D., RUIZ-ROLDÁN, M.C., DI PIETRO, A. & RONCERO, M.I.G. Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 54:63-72. 1999.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology 107:7-12. 2001.

KUZNIAK, E., PATYKOWSKI, J. & URBANEK, H. Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment. Journal of Phytopathology 147:385-390. 1999.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Analytical Biochemistry 47:273-279. 1972.

LILJEROTH, E., SANTEN, K. & BRYNGELSSON, T. PR protein accumulation in seminal roots of Barley and wheat in response to fungal infection – the importance of cortex senescence. Journal of Phytopathology 149:447-456. 2001.

PASTOR-CORRALES, MA. & ABAWI, G.S. Reactions of selected bean germplasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Disease 71:990-993. 1987.

PELT-HEERSCHAP, H.V. & BAKKER, O.S. Analysis of defence-related proteins in stem tissue of carnation inoculated with a virulent and avirulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. European Journal of Plant Pathology 105:681-691. 1999.

PIETERSE, C.M.J. & VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology 7:456-464. 2004.

QUIRINO, B.F. & BENT, A.F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. Molecular Plant Pathology 4:517-530. 2003.

REP, M., VAN DER DOES, C., MEIJER, M., VAN WIJK, R., HOUTERMAN, P.M., DEKKER, H.L., KOSTER, C.G. & CORNELISSEN, B.J.C. A small cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Molecular Microbiology 53:1373-1383. 2004.

- 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.
- RODRIGUES, A.A.C., BEZERRA NETO, E. & COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira* 31:492-499. 2006.
- SOARES, R.M., MARINGONI, A.C. & LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à murcha-de-Curtobacterium. *Fitopatologia Brasileira* 29:373-377. 2004.
- VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162. 2006.
- WHALEN, M. C. Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* 6:347-360. 2005.
- WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M., LORENC-KUKULA, K., STARZYCKI, M., OSZMIANSKI, J., KEPCZYNSKA, E. & SZOPA, J. Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65:245-256. 2004.
- ZIADI, S., BARBEDETTE, S., GODARD, J.F., MONOT, C., LE CORRE, D. & SILUE, D. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) – downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50:579-586. 2001.

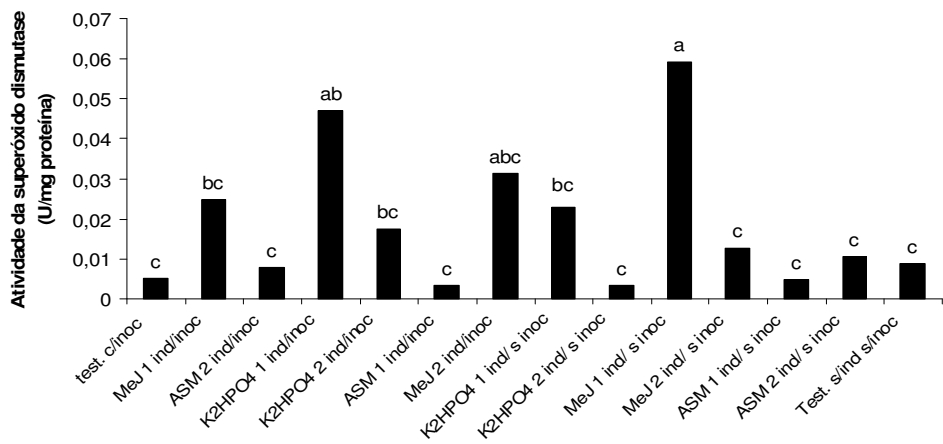
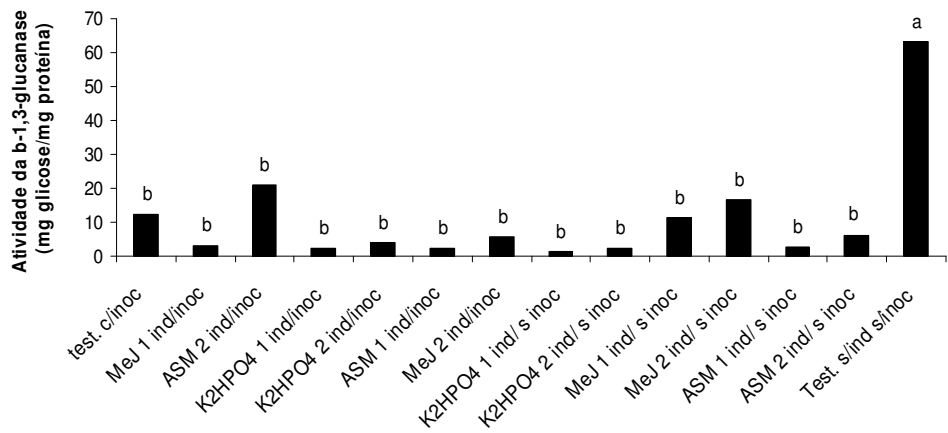
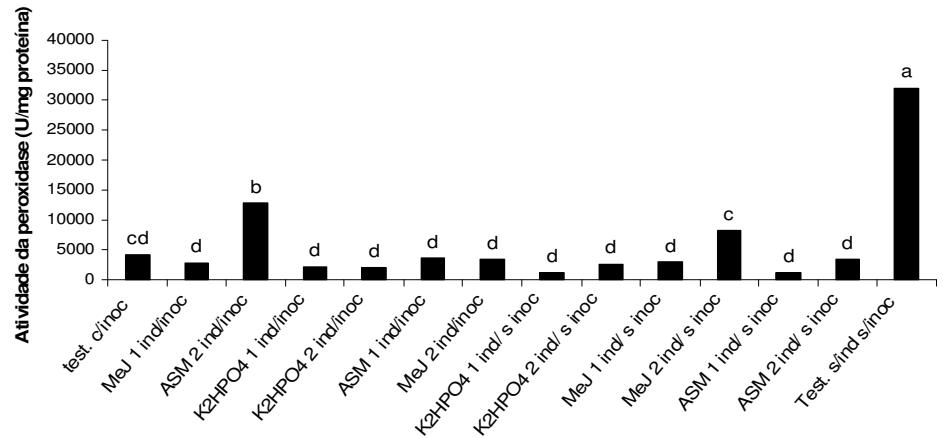


FIG 1. - Atividade enzimática em amostras de caule de plântulas de algodoeiro induzidas, inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, avaliadas após dois dias da segunda indução. Test. c/inoc. = testemunha com inoculação; MeJ 1 ind/inoc. = metil jasmonato, uma indução com inoculação; ASM 2 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, duas induções com inoculação; K₂HPO₄ 1 ind/inoc. = fosfato de potássio, uma indução com inoculação; K₂HPO₄ 2 ind/inoc. = fosfato de potássio, duas induções com inoculação; ASM 1 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, uma indução com inoculação; MeJ 2 ind/inoc. = metil jasmonato, duas induções com inoculação; K₂HPO₄ 1 ind/s inoc. = fosfato de potássio, uma indução sem inoculação; K₂HPO₄ 2 ind/s inoc. = fosfato de potássio, duas induções sem inoculação; MeJ 1 ind/s inoc. = metil jasmonato, uma indução sem inoculação; MeJ 2 ind/s inoc. = metil jasmonato, duas induções sem inoculação; ASM 1 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, uma indução sem inoculação; ASM 2 ind/s inoc. = acibenzolar-S-metil, duas induções sem inoculação; test. s/ind s/inoc = testemunha sem indução e inoculação.

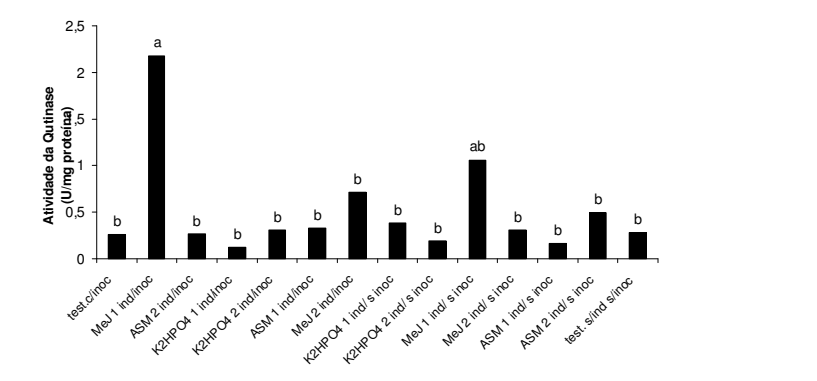
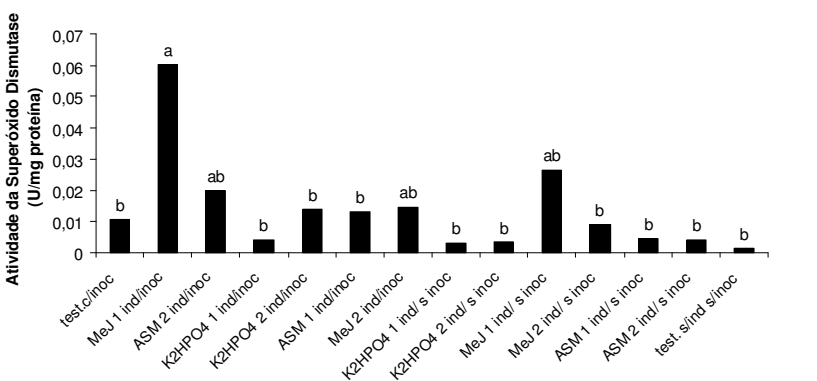
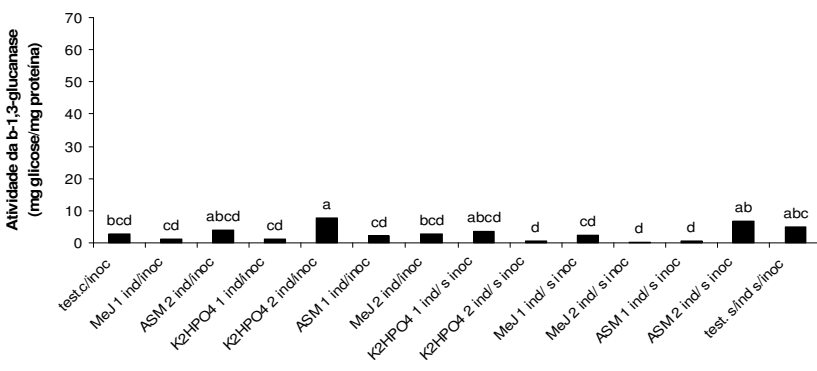
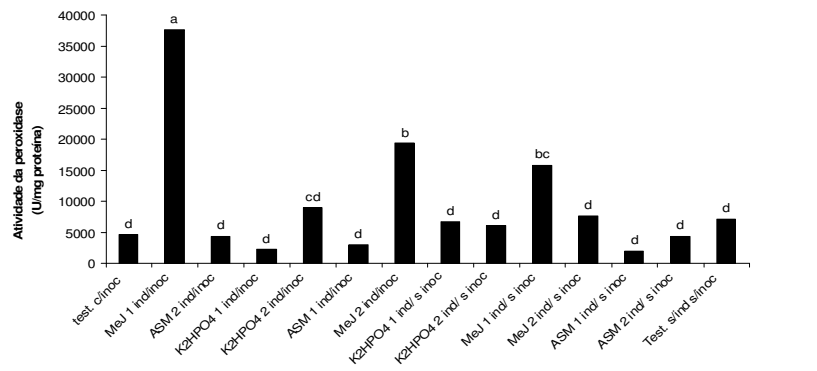


FIG. 2 - Atividade enzimática em amostras de folhas de plântulas de algodoeiro induzidas, inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, avaliadas dois dias após a segunda indução. Test. c/inoc. = testemunha com inoculação; MeJ 1 ind/inoc. = metil jasmonato, uma indução com inoculação; ASM 2 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, duas induções com inoculação; K₂HPO₄ 1 ind/inoc. = fosfato de potássio, uma indução com inoculação; K₂HPO₄ 2 ind/inoc. = fosfato de potássio, duas induções com inoculação; ASM 1 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, uma indução com inoculação; MeJ 2 ind/inoc. = metil jasmonato, duas induções com inoculação; K₂HPO₄ 1 ind/s inoc. = fosfato de potássio, uma indução sem inoculação; K₂HPO₄ 2 ind/s inoc. = fosfato de potássio, duas induções sem inoculação; MeJ 1 ind/s inoc. = metil jasmonato, uma indução sem inoculação; MeJ 2 ind/s inoc. = metil jasmonato, duas induções sem inoculação; ASM 1 ind/inoc. = acibenzolar-S-metil, uma indução sem inoculação; ASM 2 ind/s inoc. = acibenzolar-S-metil, duas induções sem inoculação; test. s/ind s/inoc = testemunha sem indução e inoculação.

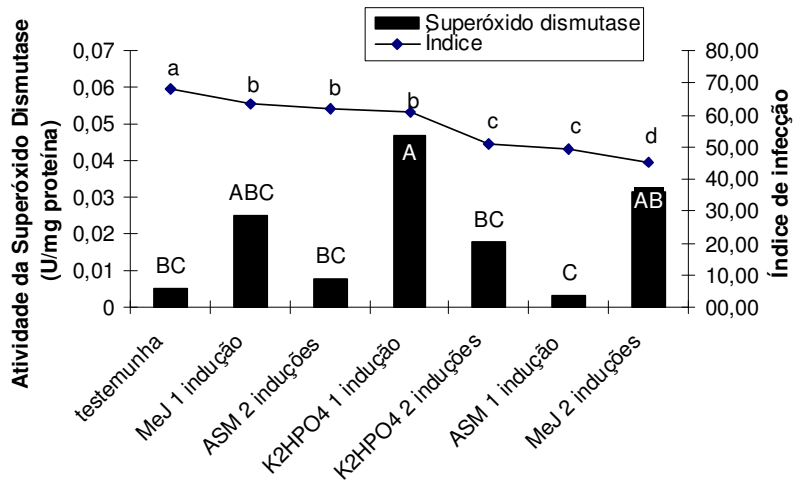
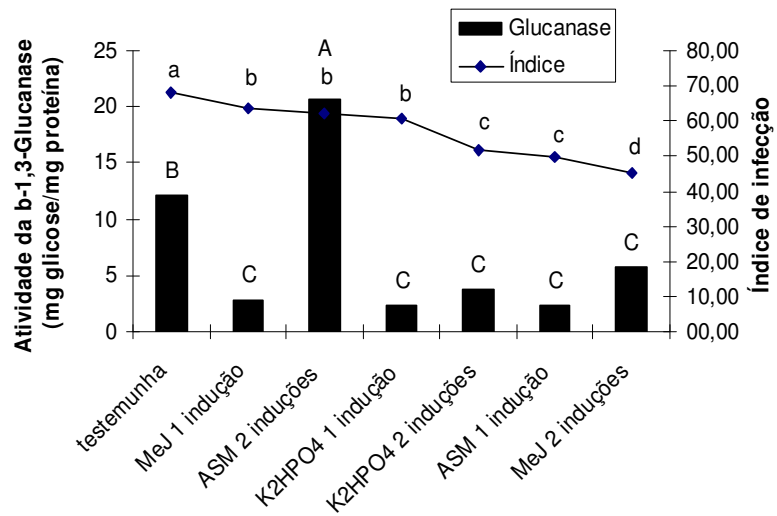
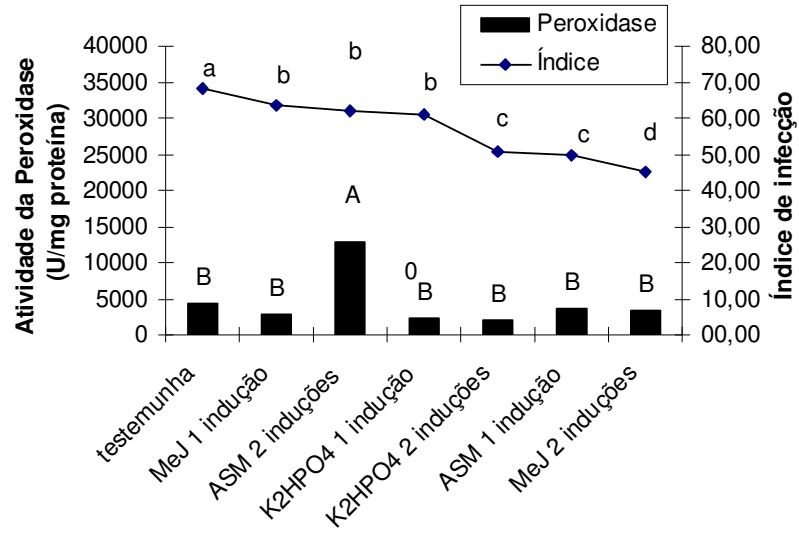


FIG 3. - Atividade enzimática em amostras de caule e índice de infecção de plântulas de algodoeiro induzidas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, avaliadas após 45 dias da inoculação. Letras minúsculas na linha e maiúsculas entre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% probabilidade. MeJ = metil jasmonato; ASM = acibenzolar-S-metil; K₂HPO₄ = fosfato de potássio.

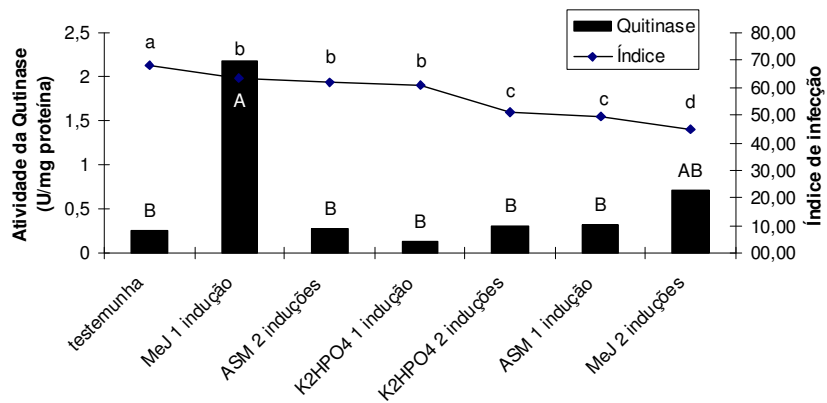
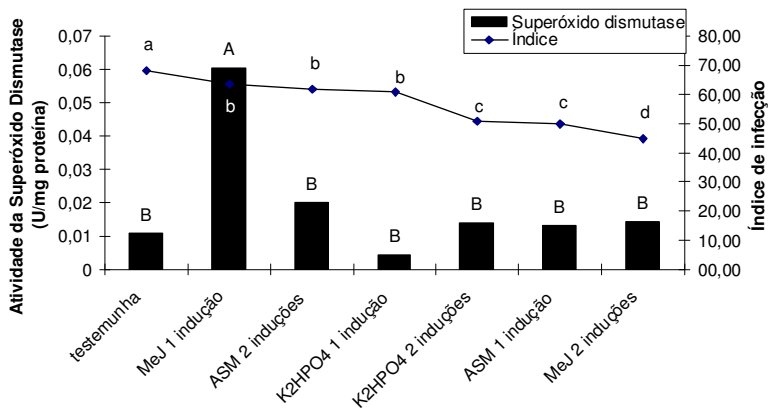
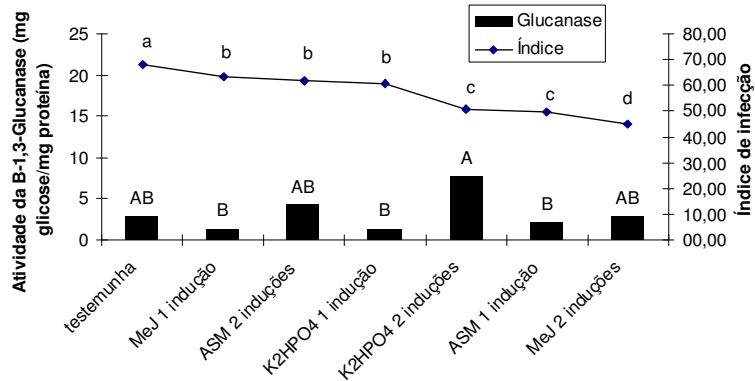
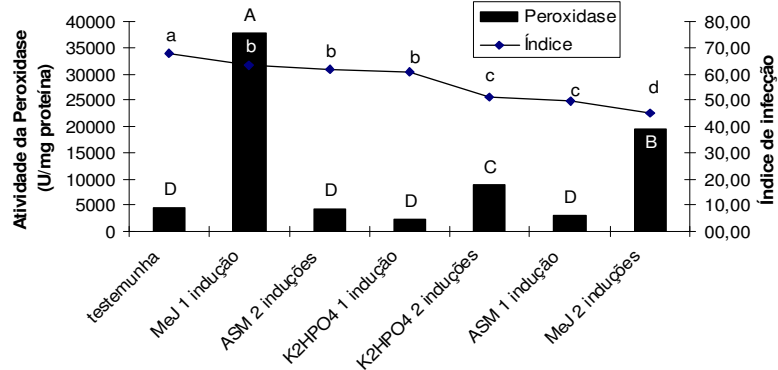


FIG 4. - Atividade enzimática em amostras de folhas e índice de infecção de plântulas de algodoeiro induzidas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, avaliadas após 45 dias da inoculação. Letras minúsculas na linha e maiúsculas entre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% probabilidade. MeJ = metil jasmonato; ASM = acibenzolar-S-metil; K₂HPO₄ = fosfato de potássio.

CONCLUSÕES GERAIS

- O método de obtenção de plântulas de algodoeiro em copo plástico foi o que proporcionou melhor desenvolvimento do sistema radicular das plântulas;
- Não se obteve sementes de algodoeiro infectadas com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* através do método da restrição hídrica;
- No método de obtenção de plântulas em papel toalha as sementes foram infectadas com parasitas contaminantes e as que germinaram originaram plântulas anormais;
- A avaliação da resistência das cultivares de algodoeiro pertencentes ao banco ativo de germoplasma da Embrapa-Algodão permitiu a identificação de genótipos com alto grau de resistência;
- No caule, as plantas testemunhas não inoculadas resultaram nos maiores níveis para as enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase;
- A inoculação com o fitopatógeno não interferiu na expressão das enzimas peroxidase e β -1,3-glucanase no caule, com exceção apenas do tratamento ASM (duas aplicações) no qual houve um aumento após a inoculação;
- Para a atividade da enzima superóxido dismutase no caule, houve variação da sua expressão quando se comparou tratamentos inoculados e não inoculados;
- Não foi detectada a enzima polifenoloxidase nas amostras de caule e folhas e também a quitinase no caule;
- Nas folhas, considerando todos os indutores utilizados, a atividade da β -1,3-glucanase foi oito vezes inferior aos níveis detectados no caule;
- Os níveis da peroxidase e superóxido dismutase foram semelhantes nas amostras de folha e caule;

- Houve um decréscimo na atividade da peroxidase nas plantas inoculadas e não inoculadas após a segunda indução com o indutor MeJ nas amostras de folhas;
- Dentre os indutores de resistência testados, metil jasmonato (duas aplicações) proporcionou o menor índice de infecção;
- No menor índice de infecção foi encontrado um alto nível da enzima superóxido dismutase no caule e peroxidase na folha.