

**JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *malvacearum* E REDUÇÃO DA MANCHA-ANGULAR DO  
ALGODOEIRO MEDIADA PELO SILÍCIO**

**RECIFE-PE**

**Outubro, 2010**

**JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *malvacearum* E REDUÇÃO DA MANCHA-ANGULAR DO  
ALGODOEIRO MEDIADA PELO SILÍCIO**

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

**RECIFE – PE**

**Outubro, 2010**

## **Ficha catalográfica**

--

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *malvacearum* E REDUÇÃO DA MANCHA-ANGULAR DO  
ALGODOEIRO MEDIADA PELO SILÍCIO**

**JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

**Prof<sup>a</sup> Dra. Elineide Barbosa da Silveira**

**Prof<sup>a</sup> Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano**

**RECIFE – PE**

**Outubro, 2010**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *malvacearum* E REDUÇÃO DA MANCHA-ANGULAR DO  
ALGODOEIRO MEDIADA PELO SILÍCIO**

**JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA**

Tese apresentada e aprovada pela Banca Examinadora em 22 de Outubro de 2010.

ORIENTADORA:

---

Profª Dra. Elineide Barbosa da Silveira

EXAMINADORES:

---

Dra. Darcy Mayra Furtado Gondim  
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

---

Dra. Maria Angélica Guimarães Barbosa  
(EMBRAPA/Semiárido – Petrolina - PE)

---

Dra. Lílian Margarete Paes Guimarães  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

---

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

**RECIFE – PE**

**Outubro, 2010**

Que nada me assuste, nada me perturbe.

Tudo passa, só Deus, porém, não muda.

A quem tem Deus nada falta.

Com paciência tudo se alcança

Só Deus me basta.

Santa Tereza D'Ávila

Aos meus pais, Manoel Lino (*In memoriam*) e Neuza Cortêz,  
exemplos de vida, integridade e sabedoria, meus eternos educadores.  
I luminaram meu caminho ensinando que a mais  
importante forma de se viver é através da infindável  
busca pelo conhecimento.

#### DEDICO

A Manoel, meu amado esposo, pelo  
incentivo, amor, dedicação, companheirismo e  
acima de tudo por compreender a minha  
ausência em muitos momentos.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo  
exemplo de vida, carinho, e confiança em mim  
depositados.

#### OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, presente em todos os momentos, pela fé e perseverança.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco** pela formação oferecida através dos cursos de Mestrado e Doutorado em Fitossanidade/Fitopatologia.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de doutorado e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pelo auxílio mobilidade discente.

As professoras **Elineide Barbosa** e **Rosa Mariano**, pelos anos de convívio, pelo apoio, pelas orientações, compreensão, conhecimentos e, sobretudo pela amizade.

A todos os **Professores do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia** pelo conhecimento transmitido e amizade.

Aos **Funcionários da Pós-Graduação em Fitopatologia** Darcy, Romildo, Adelmo e Adriana pela amizade e préstimos, em especial, ao Sr. Luís Coelho, por toda ajuda concedida nos trabalhos realizados em casa de vegetação.

A **Nelson Dias Suassuna** e **Wirton Coutinho** pesquisadores da Embrapa Algodão pela coleta do material vegetal.

A **MDM sementes Ltda** pela concessão das sementes de algodão.

Ao Professor **Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira** e **Dra. Darcy Mayra**, do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará – UFC), pela receptividade, disponibilidade e colaborações para realização de parte desse trabalho.

Ao professor **Manoel Januário da Silva Júnior** (UFERSA) pela realização das análises estatísticas.

A **Greecy Mirian** pela dedicação e colaboração nos trabalhos, além de sua amizade e compreensão.



A todos os que fazem o **Laboratório de Fitobacteriologia**, pela ajuda concedida e amizade compartilhada, em especial, a **André Xavier**, pela dedicação na execução de parte desse trabalho.

Aos colegas do **Curso de Doutorado**, Cíntia, Jeane, Frank, Alessandra, Gustavo, Sara, Isadora e Waléria, pelos momentos de estudo, estresses e alegrias vividos juntos.

As amigas **Neilza e Valéria Sandra**, pelo carinho e respeito e por estarem presentes apesar da distância pelos momentos acolhedores na dificuldade e pela partilha de sorrisos na alegria.

A **Kátia Félix e Cléia Cabral** pela acolhida, carinho, atenção e pela ajuda concedida e pelos momentos de distração.

Aos **amigos**, Daniela Salgues, Sandra, Lílian, Denise, Ralini, Larissa, Francisco Gonçalves, Virgínia, Erlen, Érika, Kirley, Andrezza, Josicleda e Josimar, por todos os momentos de alegria compartilhados.

À **todos aqueles** que de alguma forma colaboraram não apenas para realização deste trabalho como também na minha formação pessoal.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
1 - A cultura do algodoeiro .....	15
2 - Mancha-angular do algodoeiro .....	18
3 - <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> .....	22
4 - Variabilidade em bactérias fitopatogênicas .....	24
5 - Mecanismos de defesa das plantas .....	27
6 - Aspectos gerais do silício e sua ação nas plantas.....	31
6.1 - O silício na ativação dos mecanismos de defesa vegetal .....	35
Referências Bibliográficas .....	40
<b>CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DE <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> CAUSANDO MANCHA-ANGULAR EM ALGODOEIRO NO BRASIL</b> .....	<b>57</b>
Summary .....	58
Sumário .....	59
Introdução .....	60
Material e Métodos.....	61
Isolamento e identificação do patógeno .....	61
Produção de enzimas e polissacarídeo .....	62
Reação de hipersensibilidade.....	63
Sensibilidade <i>in vitro</i> a cúpricos de uso agrícola e antibióticos .....	63
Análise do polimorfismo genético por rep-PCR.....	64
Resultados e Discussão.....	66
Isolamento e identificação do patógeno .....	66
Produção de enzimas e polissacarídeo .....	67
Reação de hipersensibilidade.....	68
Sensibilidade <i>in vitro</i> a cúpricos de uso agrícola e antibióticos .....	69
Análise do polimorfismo genético por rep-PCR.....	71
Agradecimentos.....	73
Referências.....	73

<b>CAPÍTULO III - REDUÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA-ANGULAR DO ALGODOEIRO MEDIADA PELO SILÍCIO .....</b>	<b>82</b>
Resumo .....	82
Abstract.....	83
Introdução .....	84
Material e métodos .....	86
Incorporação de silício ao solo .....	86
Cultivo das plantas .....	86
Inoculação das plantas.....	87
Quantificação de componentes de resistência do algodoeiro à mancha-angular.....	87
Efeito do silício no desenvolvimento de plantas de algodoeiro .....	88
Análise do tecido vegetal do algodoeiro para conteúdo de silício e cálcio .....	88
Inibição in vitro de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> .....	89
Determinação de atividades enzimáticas e peróxido de hidrogênio .....	89
Análises estatísticas dos dados .....	90
Resultados.....	91
Quantificação de componentes de resistência do algodoeiro à mancha-angular.....	91
Efeito do silício no desenvolvimento de plantas de algodoeiro .....	91
Análise do tecido vegetal do algodoeiro para conteúdo de silício e cálcio .....	92
Inibição in vitro de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> .....	92
Determinação de atividades enzimáticas e peróxido de hidrogênio .....	92
Discussão .....	93
Referências.....	100
<b>CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>112</b>

## RESUMO

A mancha-angular, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*), é a principal doença bacteriana do algodoeiro no Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. A variabilidade de uma população de 100 isolados de *Xcm*, oriundos de plantas com sintomas típicos de mancha-angular em áreas produtoras de algodoeiro dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia, Brasil, foi analisada com base em características fenotípicas e genéticas. As enzimas amilase, lipase e celulase e o polissacarídeo levana foram produzidos por todos os isolados de *Xcm*, enquanto a caseinase foi produzida apenas por 20 isolados. Todos os isolados induziram reação de hipersensibilidade em folhas de tomateiro. Os 100 isolados foram sensíveis a oxicloreto de cobre ( $1500 \text{ mg l}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $1614 \text{ mg l}^{-1}$ ), oxitetraciclina ( $600 \text{ mg l}^{-1}$ ), oxitetraciclina ( $90 \text{ mg l}^{-1}$ ) + sulfato tribásico de cobre ( $1500 \text{ mg l}^{-1}$ ) e oxitetraciclina ( $76,6 \text{ mg l}^{-1}$ ) + sulfato de estreptomicina ( $367,2 \text{ mg l}^{-1}$ ), e resistentes a casugamicina ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ). Dentre os 18 antibióticos testados, os isolados bacterianos apresentaram reação variável a nove: ácido nalidíxico, amoxicilina, azitromicina, bacitracina, eritromicina, kanamicina, pefloxacina, tobramicina e vancomicina. Rep-PCR (REP, ERIC e BOX) revelou a formação de cinco grupos ao nível de 70% de similaridade, sendo o grupo I constituído de 98 isolados, incluindo o isolado referência de *Xcm* IBSBF1733, o grupo II, formado apenas por dois isolados oriundos da Bahia e os três outros grupos por isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* utilizados para comparação. Neste trabalho também foi avaliado o efeito do silício (Si) no controle da mancha-angular do algodoeiro, e os possíveis mecanismos envolvidos na resistência potencializada por este elemento. O silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) foi incorporado ao solo nas doses de 0,00; 0,25; 0,50; 1,50 e 3,00 g de  $\text{SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de solo 25 dias antes do plantio. Plantas com 33 dias tiveram as folhas inoculadas por infiltração com 0,5 mL de suspensão de *Xcm* ( $10^8$  UFC

ml<sup>-1</sup>). Os componentes da resistência foram avaliados a cada dois dias até 10 dias após a inoculação, quando o desenvolvimento da planta e o acúmulo de Si e Ca foram também determinados. Foram ainda analisadas a atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às 6, 12 e 24 h após a inoculação em plantas +/-Si e a inibição *in vitro* do crescimento do patógeno. Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao período de incubação, incidência da mancha-angular e inibição do crescimento da bactéria. Com a aplicação da dose 1,50 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo, observou-se redução da severidade (54,9%), da área abaixo da curva de progresso da doença (35,76%) e aumento na altura das plantas (7,04%). Não foi verificado acúmulo de Si nas folhas de algodoeiro. Níveis de proteínas solúveis e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade das enzimas SOD, APX, POX, PAL e GLU foram alterados na presença do Si (1,80 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>). Com base nas características fenotípicas e genéticas analisadas, conclui-se que a população de 100 isolados de *Xcm* estudada apresenta baixa variabilidade e que a redução da severidade da mancha-angular do algodoeiro mediada por Si está provavelmente associada aos eventos característicos de indução de resistência observados.

**Palavras-chaves:** antibióticos, cúpricos, enzimas, *Gossypium hirsutum*, rep-PCR, indução de resistência, silicato de cálcio

## ABSTRACT

The bacterial blight caused by *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) is the most important bacterial disease of cotton in the Middle-West and Northeast Regions of Brazil. The variability of a population formed by 100 *Xcm* strains obtained from commercial fields in the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Bahia, Brazil, was analyzed based upon genetic and phenotypic characteristics. The enzymes amylase, lipase, cellulase and the polysaccharide levan were produced by all *Xcm* isolates while the caseinase was only produced by 20 strains. All strains induced hypersensitivity reaction in tomato leaves. The 100 strains were sensitive to copper oxychloride (1500 mg L<sup>-1</sup>), copper hydroxide (1614 mg L<sup>-1</sup>), oxytetracycline (600 mg L<sup>-1</sup>), oxytetracycline (90 mg L<sup>-1</sup>) + tribasic copper sulfate (1500 mg L<sup>-1</sup>) and oxytetracycline (76.6 mg L<sup>-1</sup>) + streptomycin sulfate (367.2 mg L<sup>-1</sup>), but resistant to kasugamycin (60 mg L<sup>-1</sup>). Among the eighteen tested antibiotics the strains presented variable reaction in relation to: nalidixic acid, amoxicillin, azithromycin, bacitracin, erythromycin, kanamycin, pefloxacin, tobramycin and vancomycin. Rep-PCR (REP, ERIC and BOX) showed the formation of five groups at 70% similarity level. Group I contained 98 strains, including the reference strain *Xcm* IBSBF1733, group II contained only two strains from Bahia and the other three groups included strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* used for comparison. This work also evaluated the effect of silicon (Si) on the bacterial blight of cotton control and the putative mechanisms involved in the resistance potentialized by this element were evaluated. Calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>) was incorporated into the soil at concentrations of 0.00, 0.25, 0.50, 1.50 and 3.00 g of SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> soil 25 days before planting. Leaves of 33-day-old-plants were inoculated by infiltration with 0.5 mL suspension of *Xcm* (10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>). Components of resistance were evaluated every two days until 10 days after inoculation, at which point plant development

and the accumulation of Si and Calcium (Ca) were also determined. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and the activity of enzymes related to plant defenses were analyzed at 6, 12 and 24 hours after inoculation in plants +/-Si. *In vitro* inhibition of pathogen growth due to Si was also assessed. No significant difference was seen among the treatments regarding incubation period, disease incidence or inhibition of bacterial growth. However, with the application of 1.50 g of SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> of soil, a reduction in severity (54.9%) was observed along with a reduction in the area under the disease progression curve (35.76%) and an increase in plant height (7.04%). There was no observable accumulation of Si in the cotton leaves. Levels of soluble proteins and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and activity of the enzymes SOD, APX, guaiacol peroxidase, PAL and β Glu were altered in the presence of Si (1.80 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>). Thus based on the genetic and phenotypic characteristics studied we conclude that the population of 100 *Xcm* strains presents low variability, and that the reduction of cotton bacterial blight severity mediated by Si is probably associated to the characteristic events of induced resistance observed.

**Key words:** antibiotics, copper based products, enzymes, *Gossypium hirsutum*, rep-PCR, induced resistance, calcium silicate

## **Capítulo I**

---

### **Introdução geral**



## INTRODUÇÃO GERAL

### 1 - A cultura do algodoeiro

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas, tendo registros de uso há mais de 4.000 anos. Devido às poucas exigências em relação ao solo e ao clima, pode ser cultivado praticamente em todos os continentes, tendo maior importância econômica social, devido ao grande número de empregos gerados direta e indiretamente (RICHETTI; MELO FILHO, 2001).

O algodoeiro é uma planta de amplo aproveitamento. O caroço ou semente, que representa em torno de 65% do peso da produção, é rico em óleo e contém 20-25% de proteína bruta. O óleo extraído da semente é refinado e destinado à alimentação humana e à fabricação de margarina e sabão. O bagaço, subproduto da extração do óleo, em forma de farelo ou torta é destinado à alimentação de bovinos, aves e suínos, devido ao alto valor protéico (40-45% de proteína bruta). Os restos de cultura como caule, folhas, maçãs e capulhos são utilizados na alimentação de animais em geral (SOAVE; MORAES, 1987). A fibra, representando 35% do peso da produção (WATKINS, 1981), tem mais de 400 aplicações industriais, entre as quais a confecção de fios para tecelagem, algodão hidrófilo para enfermagem, confecção de feltro de cobertores, de estofamentos e obtenção de celulose, entre outros (SOAVE; MORAES, 1987).

A cultura do algodoeiro destaca-se pela importância econômica e social, estando em sexto lugar entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário brasileiro, superada apenas pela soja, milho, feijão, arroz e trigo. Os estados com maior produção são Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Goiás (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO - ABRAPA, 2010).

O Brasil possui 831,35 ha de área plantada com produção estimada em 3.268,10 mil t em caroço. Em pluma, a expectativa é de se colher 1.904,3 mil t, com rendimento médio

da ordem de 3.758 kg/ha, colocando o Brasil como quinto maior produtor mundial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009) Neste contexto, o Nordeste participou com 28% da área plantada (331 mil ha) e com 34% da produção (1.001,557 mil t) (CONAB, 2010; IBGE, 2009). Os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul concentraram mais de 50% da produção nacional; a Bahia e o Piauí se destacaram no Nordeste, com a produção de algodão de agricultura familiar de forma sustentável (FREIRE, 2006).

Para a safra de 2010/2011, a previsão para a área agrícola no país chega a aproximadamente 65 milhões de ha. Deste total, estimam-se que 915 mil ha sejam plantados com algodão, sendo que os Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul representarão cerca de 60% da área plantada (CONAB, 2010).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), levando em consideração as condições climáticas normais, os principais produtores do mundo (China, Índia, Estados Unidos, Paquistão, Brasil e Austrália) terão em 2010 as maiores safras, devido à elevação dos preços globais do produto. A China, com uma produção de 7,62 milhões de t, é o maior produtor e importador de algodão, e também o principal fabricante têxtil.

Outro destaque do Brasil se deve à produtividade obtida não só na região dos Cerrados, mas em todo o território no qual o algodão é cultivado, com valores superiores a 1.300 kg/ha de pluma, os maiores do mundo em condições de sequeiro (ABRAPA, 2010; CONAB, 2010).

A produção brasileira deve continuar crescendo gradativamente, uma vez que a indústria têxtil de todo o mundo vem demandando maiores quantidades de matéria-prima a cada ano. A utilização de tecnologia de ponta permite a obtenção de maiores níveis de

produtividade e a melhora na qualidade da pluma, o que é fundamental na comercialização do produto. Nos próximos anos, com a incorporação de novas tecnologias no processo produtivo, o custo da produção tende a reduzir, o que dá ao produto um valor mais competitivo. Ao contrário dos demais países, o Brasil é o único do mundo que tem condições de aumentar a produção, pois ainda dispõe de recursos naturais a serem empregados no processo produtivo (CONAB, 2010).

Em meados da década de 80 a cultura do algodoeiro entrou em crise, que se prolongou por quase dez anos. Essa crise se deu primeiramente devido ao impacto do bicudo (*Anthonomus grandis* Boh.) nos sistemas de produção dos pequenos produtores do Nordeste, porém a principal causa foi a retirada dos subsídios agrícolas por parte do governo e os baixos preços do produto (FREIRE; COSTA; ANDRADE, 1999).

A retomada da produção de algodão no Brasil, principalmente com o deslocamento do eixo produtor do Nordeste para o Centro-Oeste, a utilização de cultivares obtidas em outras regiões e as novas condições ambientais, levou ao agravamento de problemas fitossanitários (CIA et al. 2002).

Dentre os fatores que limitam o rendimento do algodoeiro, destacam-se as doenças, que causam cerca de 20% de danos (GONDIM; BELOT; MICHEL, 1996). Na literatura são relatados muitos patógenos na cultura do algodoeiro, dos quais 90% são fungos, além de 16 vírus, dois fitoplasmas, 10 nematóides e uma bactéria (CIA et al., 1997).

Entre as doenças, uma das mais importantes é a bacteriose também chamada de mancha-angular ou crestamento bacteriano, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad et al. (*Xcm*), que ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras no mundo, causando sintomas em toda a planta. É uma doença de importância econômica para o Brasil e a severidade depende de fatores climáticos e da cultivar (ZANDONÁ et al., 2005).

A mancha-angular do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad *et al.* (*Xcm*) é uma das doenças mais importantes para essa cultura no mundo (BAYLES; VERHALEN, 2007). No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado por Bitancourt durante os anos de 1931 e 1932 no Instituto Biológico de São Paulo (BITANCOURT, 1934). Segundo Chaves Batista (1953) ocorria em todo o Brasil sobre o algodoeiro herbáceo embora fosse assinalada em algodoeiro arbóreo nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. A partir de 1990, vem se tornando potencialmente destrutiva quando as condições ambientais são favoráveis (SUASSUNA *et al.*, 2006).

## **2 - Mancha-angular do algodoeiro**

Potencialmente, a mancha-angular é muito destrutiva. Quando as condições ambientais são favoráveis à infecção e disseminação do agente causal, as perdas podem ser significativas (SUASSUNA *et al.*, 2006). Não há registros na literatura de dados consistentes sobre perdas na produtividade de algodão brasileiro provocadas por este agente patogênico, porém, os maiores danos provocados pela mancha-angular no algodoeiro têm sido registrados nos estados da região Centro-Oeste e em alguns estados da região Nordeste (CASSETARI NETO; MESQUITA NETO; SANTOS, 2001; CIA; FUZATTO, 1999).

Os sintomas característicos da doença estão presentes nas folhas mais novas e naquelas que ainda não se abriram. Quando a bactéria alcança o floema de nervuras primárias ou secundárias de folhas mais novas, as lesões surgem ao longo das nervuras, abrangendo uma pequena faixa do tecido do mesófilo adjacente e estende-se ao longo dos pecíolos (Figura 1A, B e C). Em casos mais severos, ocorre coalescência das lesões e rasgadura do limbo foliar (CIA; SALGADO, 2005). Há queda de folhas quando se segue um período seco.

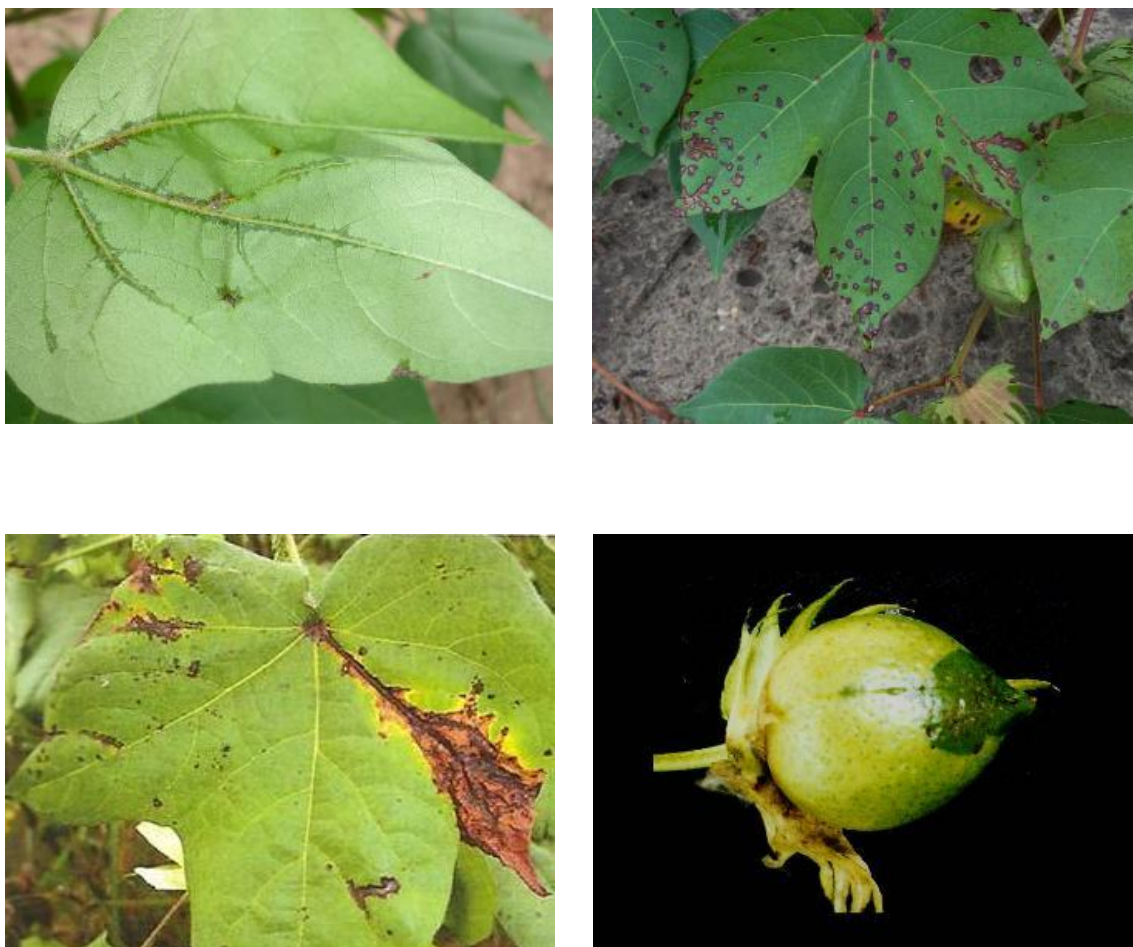


Figura 1 - Sintomas da mancha-angular em folhas (A, B e C) e maçã (D) do algodoeiro (Fotos: Wirton Coutinho, CNPA)

Nos caules e ramos, podem ser observadas lesões deprimidas, escuras e alongadas, que atingem vários centímetros de comprimento e se estendem longitudinal e transversalmente. Em casos de alta severidade, além do dano devido à redução da área foliar é comum a infecção de maçãs (MIRANDA; SUASSUNA, 2004). Nestas as lesões podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento. Maçãs jovens afetadas podem morrer e cair; já nas mais desenvolvidas há formação de lesões úmidas e arredondadas (Figura 1 D) que, posteriormente, se tornam deprimidas e de coloração escura. Estas lesões podem atingir as fibras, e, o patógeno pode afetar as sementes e nestas sobreviver (LIMA; ARAÚJO, 2000).

Em plântulas provenientes de sementes infectadas, os cotilédones apresentam manchas arredondadas, lesões de aspecto oleoso e coloração parda, enquanto no hipocótilo observa-se cancro negro, que pode provocar anelamento deste órgão e morte da plântula (GONDIM; BELOT; MICHEL, 1996).

Para o desenvolvimento de epidemia da mancha-angular, além do plantio de cultivares suscetíveis, alta umidade relativa (85%), presença de vento, temperatura atmosférica entre 30 e 36°C e a alternância de temperaturas altas durante o dia com temperaturas mais amenas à noite, favorecem a manifestação de sintomas até mesmo em cultivares consideradas geneticamente mais resistentes (BRINKERHOFF, 1970; LIMA; ARAÚJO, 2000). O patógeno penetra mais comumente no tecido vegetal através de aberturas naturais do que por ferimentos (KLEMENT; RUDOLPH; SANDS, 1990). Solo com alta umidade também aumenta a severidade da doença. O molhamento foliar, neblina, nevoeiro, água da chuva e o orvalho intenso são fatores importantes na disseminação dentro da lavoura. As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são as mesmas requeridas para a cultura do algodoeiro (KLEMENT, RUDOLPH; SANDS, 1990).

Segundo Schnathorst (1964), que estudou a disseminação de *Xcm* por sementes, o fato da enfermidade surgir em locais onde o algodoeiro não era plantado há mais de 12 anos só podia ser explicado pela veiculação do patógeno pelas sementes usadas no plantio. Este mesmo autor observou que as sementes podiam ser contaminadas em descaroadores onde anteriormente haviam sido beneficiados capulhos provenientes de plantas infectadas. Desta forma, a semente do algodoeiro constitui-se na principal fonte de inóculo de *Xcm* em lavouras antes consideradas livres da bactéria, a qual pode ser transmitida internamente das sementes para a plântula causando doença e reduzindo a produtividade da lavoura. No entanto, o cultivo contínuo de algodão contribui para o aumento do inóculo inicial, já que o

patógeno sobrevive de um ano para outro em restos de cultura infectados (SUASSUNA et al., 2006).

Cia e Salgado (2005) relataram que *Xcm* é muito resistente à dessecação, calor seco e radiação solar, podendo sobreviver por vários anos no solo (até 11 anos), na semente (até quatro anos), nas folhas, caule e capulho infectados.

O manejo da doença deve ser implementado, sobretudo com o uso de cultivares resistentes e sementes livres do patógeno, sendo indicadas também medidas culturais, como: deslincamento das sementes com ácido sulfúrico, rotação de culturas, espaçamento, adubação, aração, gradagem e “roguing” (CASSETARI NETO; MACHADO, 2000). O único princípio ativo registrado para o controle químico da mancha-angular do algodoeiro é o oxicloreto de cobre que apenas retarda o progresso da doença. Quando ocorrem longos períodos chuvosos, o uso deste produto é ineficiente, pois, além da chuva removê-lo das folhas, favorece a disseminação da bactéria (MIRANDA; SUASSUNA, 2004). Devido aos problemas relacionados ao controle químico desta bacteriose, as pesquisas têm sido direcionadas principalmente para a obtenção de cultivares resistentes e de boa aceitação comercial (ZANDONÁ et al., 2005).

De acordo com Suassuna et al. (2006), existem cultivares resistentes à mancha-angular, como a BRS 269 Buriti, Delta Opal e FiberMax 966 e algumas com níveis aceitáveis de resistência como BRS Sucupira e BRS Aroeira. Porém, as cultivares mais plantadas no Brasil Delta Pine, Acala 90 e ITA 90 por serem suscetíveis, vêm aumentando a incidência desta bacteriose nos últimos anos (SIQUERI, 2005). É necessário o desenvolvimento de alternativas e novas tecnologias para o manejo da mancha-angular, dentre elas, o uso de indutores de resistência.

O silício tem sido testado como indutor de resistência no manejo de doenças de plantas, com resultados promissores no controle da brusone do arroz (CHANG et al.,

2002), cercosporiose do cafeeiro e cancro da haste da soja (LIMA et al., 2009), murcha-bacteriana do tomateiro (DANNON; WYDRA, 2004), mancha-aquosa do meloeiro (FERREIRA, 2009), mancha-bacteriana em maracujazeiro (BRANCAGLIONE et al., 2009) e estria bacteriana do trigo (SILVA et al., 2010). Em algodoeiro, Ishida et al. (2007) obtiveram redução dos sintomas da mancha-angular em casa de vegetação com uso de silicato de potássio.

### **3 - *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum***

*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica e móvel por meio de um flagelo polar; células visíveis ao microscópio óptico, onde apresentam morfologia de bastonetes retos, isolados, medindo 0,4-0,7 x 0,7-2,0 µm. As colônias apresentam em meio Kado 523 coloração que varia de amarelo claro a amarelo escuro, dependendo do isolado; são convexas e lisas, brilhantes e com bordos inteiros. Tem crescimento ótimo à temperatura entre 25 e 30°C. A coloração amarelada é devido à presença de um pigmento amarelo, insolúvel, denominado de xantomonadina (BRADBURY, 1986). Dentre as características fisiológicas e bioquímicas para descrever o gênero *Xanthomonas* pode-se citar oxidase negativa, catalase positiva, negativa para a produção de indol, acetoina e urease, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não redutora de nitrato e positiva para hidrólise do amido (HOLT et al., 1994).

Esta bactéria foi descrita inicialmente por Smith em 1901, que a denominou *Pseudomonas malvacearum*. Em 1905, a sua denominação foi alterada por Smith para *Bacterium malvacearum* e por Holland em 1920 para *Bacillus malvacearum*. Mais tarde, em 1923, Bergey et al. propuseram alteração para *Phytomonas "malvacera"*, e com a criação do gênero *Xanthomonas* por Dowson em 1939, a bactéria passou a ser designada como *Xanthomonas malvacearum*. Em 1978, com a criação da terminologia "patovar",



Dye propôs a denominação *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (BRADBURY, 1986).

A combinação de dados de homologia DNA-DNA, dados fenotípicos de diferentes grupos da espécie, análise de carboidratos por BIOLOG e características de patogenicidade levaram Vauterin et al. (1995) a propor uma nova classificação do gênero *Xanthomonas*. A espécie mais numerosa, *X. campestris*, foi dividida em 16 espécies: *X. campestris*, *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. axonopodis*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. Nesta classificação, *X. campestris* pv. *malvacearum* foi alocada na espécie *X. axonopodis* sendo denominada *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.

Em 2005, Schaad et al. sugeriram a reclassificação de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* para *X. smithii* subsp. *smithii*, mas pouco tempo depois o mesmo grupo de pesquisadores elaborou uma emenda e, seguindo as regras estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias foi proposta a nomenclatura *X. citri* subsp. *malvacearum* (SCHAAD et al., 2006). Recentemente, Ah-You et al. (2009) propuseram que a espécie *X. citri* seja dividida em vários patovares, incluindo *X. citri* pv. *malvacearum*.

No presente trabalho foi mantida a denominação *X. citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*), em razão da validação na lista 115 do *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (EUZÉBY, 2007).

Em plantas de algodoeiro, já foram descritas 32 raças patogênicas de *Xcm*, sendo que no Brasil já foram identificadas sete (VERMA; SINGH, 1974; JULIATTI; POLIZEL, 2003). De acordo com Suassuna et al. (2006) a severidade da doença varia dependendo da cultivar em uso, havendo, portanto, raças fisiológicas. No Brasil, até o início dos anos 80, ocorriam as raças 3, 7, 8, 10, 13, 18 e 19 dessa bactéria. Novas raças surgem rapidamente

quando cultivares de algodoeiros com um único gene de resistência são expostos a epidemias da doença. As diferenças de virulência entre as raças de *Xcm* podem ser explicadas pela variação na quantidade e qualidade da camada de exopolissacarídeo (ZACHOWSKI; EBRAHIMNESBAT; RUDOLPH, 1989).

#### **4 - Variabilidade em bactérias fitopatogênicas**

Um dos aspectos mais dinâmicos e significativos da biologia é que as características dos indivíduos dentro de uma espécie não são fixas, ou seja, não são idênticas e sim variáveis de um indivíduo para o outro (AGRIOS, 2005). Os microrganismos têm que se adaptar a uma série de variações ambientais como mudanças na nutrição, pH, temperatura e relação com o oxigênio, dentre outros fatores, para conseguir sobreviver. A habilidade de se adaptar a variáveis ambientais, tanto separadamente quanto em conjunto, é função da diversidade genética, mas é refletida fisiologicamente (CALDWELL, 2000).

Variações genótípicas ocorrem em razão da transferência de material genético de um indivíduo para outro por diferentes processos (ROMEIRO, 2005). Os principais mecanismos geradores de variabilidade em bactérias incluem os processos de mutação somática, conjugação, transformação, transdução e herança extracromossômica (plasmídios) (AZEVEDO; MARIANO; MICHEREFF, 2000). A alta plasticidade genética e o grau de dependência em relação aos fatores ambientais fazem com que fitopatógenos estejam mais sujeitos a variações genótípicas e fenotípicas do que os vegetais superiores (COSTA; MARIANO; MICHEREFF, 2001). Isso leva ao surgimento de populações com diversos níveis de variabilidade. O conhecimento da variabilidade de um fitopatógeno auxilia no entendimento da evolução da espécie, na formação de novas espécies e raças, no desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos de diagnose de doença, na detecção de patógenos em sementes, e, principalmente, na escolha das estratégias de manejo (COSTA;

MARIANO; MICHEREFF, 2001) e tem relevância em trabalhos de melhoramento para criação de novas cultivares com resistência a doenças (ROMEIRO, 1988).

No estudo de populações de fitopatógenos os tipos de variabilidade mais freqüentemente pesquisadas são características patogênicas, bioquímicas e moleculares, sensibilidade a cúpricos e antibióticos e adaptação a diferentes genótipos do hospedeiro (BROWN, 1998).

A aplicação de cúpricos e antibióticos é, na maioria das situações, a principal estratégia utilizada para o controle de bacterioses de plantas. No entanto, um dos grandes problemas na utilização do controle químico é a ocorrência natural de isolados bacterianos resistentes, mesmo se nunca expostos anteriormente a antibióticos (ROMEIRO; VIEIRA JÚNIOR, 2005), bem como o surgimento de populações resistentes devido ao uso continuado dos mesmos (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; ROMEIRO, 2005). Desta forma, quando vários isolados de uma mesma bactéria fitopatogênica são testados para sensibilidade a um conjunto fixo de antibióticos, há tendência de se traçar um perfil característico da espécie em relação à sensibilidade (ROMEIRO et al., 1993). De maneira semelhante, a sensibilidade a fungicidas pode ser utilizada para caracterizar populações de microrganismos (SILVA NETO et al., 2003).

Por sua vez, diferentes técnicas baseadas na análise do DNA possibilitam detectar essa diversidade genética, permitindo a diferenciação entre espécies e isolados de patógenos e detecção em uma dada amostra (LOUWS et al., 1994), além da capacidade de produzirem fingerprints que revelam a variabilidade intraespecífica do patógeno (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Vários métodos moleculares têm sido utilizados para caracterizar a diversidade e detectar fitopatógenos. A presença de sequências repetitivas de DNA é comum no genoma de procariotos e eucariotos. Em bactérias, a observação da ocorrência de três famílias de

sequências repetitivas intergênicas, conhecidas como elementos REP (*repetitive extragenic palindromic*), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) e BOX, propiciaram o desenvolvimento de protocolos baseados na produção de perfis de DNA repetitivos no genoma por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), referido como rep-PCR, no qual *primers* são desenvolvidos para amplificar a região intergênica do DNA entre duas sequências repetitivas adjacentes (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJN, 1999). Dessa forma, os fragmentos amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose, gerando perfis específicos. Além disso, nem o conhecimento prévio da estrutura genômica de uma determinada espécie e nem uma seleção inicial de *primers* são necessários (LOUWS et al., 1994).

O uso de rep-PCR tem sido útil para identificação e diferenciação de isolados e para avaliação da diversidade genética de bactérias como *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (LOUWS et al., 1994). A análise da sequência 16S rDNA mostra variabilidade limitada e não tem resolução suficiente para diferenciação de todas as espécies. Em contrapartida, a alta correlação entre estudos de homologia DNA-DNA, rep-PCR e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) sugere que estes métodos podem ser considerados como ferramentas na sistemática bacteriana (RADEMAKER et al., 2000).

Conhecimentos sobre a estrutura populacional de *Xcm* podem contribuir para o desenvolvimento de um programa de melhoramento vegetal eficiente na obtenção de cultivares resistente a esta doença, haja vista, que sua principal medida de controle é a resistência varietal (SUASSUNA et al., 2006).

Abdo-Hasan et al. (2008) realizaram caracterização molecular de raças de *Xcm* que ocorrem na Síria. O estudo foi realizado com 40 isolados de *Xcm*, selecionados de uma população de 200, os quais foram testados contra dez cultivares diferenciadoras de algodoeiro. Desse total, nove eram raças definidas as quais foram usadas para detectar

diversidade genética, pelas técnicas de ISSR – PCR e RAPD. Concluiu-se que ambas as técnicas revelaram alto grau de polimorfismo entre as raças estudadas, e que a análise do DNA genômico utilizando marcadores RAPD e ISSR é um método de tipagem adequado para ambas as técnicas, por ser rápido sensível e confiável na determinação de relações genéticas entre isolados de *Xcm*.

Huang et al. (2008) encontraram um isolado altamente virulento, reportado possivelmente como uma nova raça de *Xcm*, infectando todas as cultivares comerciais de algodoeiro, inclusive uma cultivar resistente, embora os sintomas produzidos diferissem completamente daqueles associados à mancha-angular. Estudos baseados em rep-PCR e DNA fingerprinting confirmaram esse isolado como *Xcm*.

Nunes et al. (2009) estudando a variabilidade genética entre 61 isolados de *Xcm*, provenientes de diversas cultivares e regiões do Brasil, através de RAPD, rep-PCR e análise da região espaçadora 16S-23S rDNA, observaram através de um dendrograma construído com os dados combinados de ERIC e REP baixo nível de polimorfismo (<30%). Foi possível detectar aproximadamente 85% de similaridade, com dois principais grupos de *Xcm*. O primeiro grupo foi formado pela maioria dos isolados provenientes do Mato Grosso e Goiás, enquanto que, o segundo foi obtido por isolados de São Paulo.

## **5 - Mecanismos de defesa das plantas**

As plantas em ambiente natural são constantemente desafiadas por um grande número de agentes fitopatogênicos potenciais, principalmente fungos, bactérias e nematóides. Os fatores determinantes da resistência de plantas a fitopatógenos estão relacionados a um grande arsenal de mecanismos de defesa constitutiva e induzida (ODJAKOVA; HADJIIVANOVA, 2001). As defesas constitutivas (pré-formadas) típicas que são as barreiras estruturais (ceras, cutinas, suberina, lignina, compostos fenólicos, celulose, calose e proteínas da parede celular) que são rapidamente reforçadas no processo

de infecção; e também as químicas. Assim, as plantas possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa que podem contribuir para resistência. Esses mecanismos de resistência são geneticamente determinados e a efetividade mostra-se dependente da expressão dos mesmos no momento certo, em magnitude adequada e em uma seqüência lógica, após o contato do agente estressante com o vegetal. A possibilidade de ativação dos genes responsáveis por esses mecanismos de resistência, sob condições especiais, torna as plantas mais resistentes aos patógenos e aos estresses ambientais, abrindo portas para estudos envolvendo o fenômeno da indução de resistência em plantas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

A indução de defesas das plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos bióticos presentes em: extratos de plantas (STANGARLIN, et al., 1999), preparações de leveduras (STADNIK; BUCHENAUER, 2000), exopolisacarídeos bacterianos (BACH; BARROS; KIMATI, 2003), rizobactérias promotoras de crescimento (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002), fungos promotores de crescimento (MADI; KATAN, 1998), e ainda raças não virulentas do patógeno (MONOT et al. 2002), além do próprio patógeno inativado pelo calor (BACH; BARROS; KIMATI, 2003). Pode-se ainda utilizar elicitores abióticos químicos ou físicos, como silício (Si) (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994), ácido salicílico (AS) (CIPOLLINI, 2002), cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico (BÉCOT et al., 2000), acibenzolar-Smetil (ASM) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (BESSER et al., 2000), fosfato de potássio monobásico (REUVENI et al., 2000), ácido jasmônico (AJ) (CIPOLLINI, 2002) ou luz em comprimentos de onda específicos (KHANAM et al., 2005).

As plantas possuem respostas de defesa ativa que podem ser induzidas por todas as classes de patógenos vegetais e por moléculas eliciadoras tanto do próprio hospedeiro como do patógeno. A resposta induzida envolve mecanismos como: (a) a explosão

oxidativa, quando ocorre aumento rápido e transitório de espécies reativas de oxigênio; (b) resposta hipersensitiva (HR), caracterizada por morte celular rápida e localizada no sítio de infecção; (c) acúmulo de metabólitos secundários, por exemplo, de fitoalexinas; (d) produção de moléculas sinalizadoras tais como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno; (e) indução de enzimas hidrolíticas; (f) deposição de lignina para reforçar a parede celular; (g) formação de papila; e (g) biossíntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (JEANDET et al., 2002; VAN LOON; PIETERSE, 2006; BERGER SINHA, ROITSCH, 2007; COLLINGE, 2009).

Na explosão oxidativa, o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), íon superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxilas (-OH), constitui-se num importante mecanismo de defesa vegetal (TORRES; JONES, DANGL, 2006). De fato, quando atacadas por patógenos, plantas ativam uma série de mecanismos que inclui o rápido acúmulo dessas espécies reativas de oxigênio. As EROs podem funcionar na defesa vegetal por ação tóxica direta contra o patógeno, formação de lignina, produção de fitoalexinas e reação hipersensitiva, que restringe o desenvolvimento do patógeno (HAMMERSCHMIDT, 2005; TOMÁNKOVÁ et al., 2006). Quando em excesso, as EROs podem levar à oxidação de proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA, causando danos celulares e eventual morte da célula vegetal (HALLIWELL, 2006). Para evitar tais danos, as plantas possuem eficientes sistemas antioxidantes não enzimáticos (carotenóides e ascorbato) e enzimáticos. Participando do sistema enzimático, estão às enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), além de outras.

As dismutases de superóxido (SOD) são metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio a partir do íon superóxido, constituindo a primeira linha de defesa celular contra as EROs. O excesso de peróxido de hidrogênio deverá ser também

rapidamente eliminado das células (BIAN; JIAN, 2009). Em plantas, as SODs são encontradas principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos, sob diferentes isoformas.

As peroxidases (POX) estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons de  $H_2O_2$  usando diferentes substratos reduzidos como doadores. As peroxidases de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (SYROS et al., 2004). O aumento de peroxidases tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microrganismos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Outra classe de proteínas envolvidas com a defesa vegetal são as PR-proteínas. Estas proteínas estão ausentes ou presentes em pequenas quantidades em plantas saudáveis, mas se acumulam em grandes quantidades após reconhecimento, pela planta, da presença de um agressor (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; FERREIRA et al., 2007). Dentre as PR-proteínas, as peroxidases de fenóis estão associadas com processos ligados ao reforço da parede celular, tais como oxidação de fenóis e lignificação de células vegetais hospedeiras durante a reação de defesa contra agentes patogênicos (ALMAGRO et al., 2009). Restrição à infecção por patógenos tem sido correlacionada com o aumento da atividade de POX por vários pesquisadores (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005; YAO; TIAN, 2005; FERNANDES et al., 2006).

As PR-proteínas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases, são consideradas proteínas genuinamente antifúngicas (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Há evidências de que estas enzimas exercem, no mínimo, duas funções no controle de doenças. São capazes de catalisar a degradação da parede celular de fitopatógenos, compostas por  $\beta$ -1,3-glucanos e



quitina, e de liberarem oligossacarídeos biologicamente ativos (elicitores), capazes de regular o estado de imunização da planta (AMBORABÉ et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2008). Vários trabalhos correlacionam o aumento da expressão destas enzimas com mecanismos de defesa vegetal (CAVALCANTI et al., 2007; RESENDE et al., 2007).

A via dos fenilpropanóides é uma das mais importantes vias do metabolismo secundário vegetal que produz uma variedade de compostos fenólicos relacionados à defesa. A fenilalanina amônia liase (FAL) é a enzima chave do metabolismo de fenilpropanóides. Catalisa a formação do ácido *trans*-cinâmico, precursor de vários compostos de defesa das plantas (WEN et al., 2005). Vários trabalhos relacionam a indução dessa enzima e aumento da defesa vegetal (YAO; TIAN, 2005; BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005; BARRETO et al., 2007).

De maneira geral, uma resposta de defesa apropriada das plantas vem da percepção de sinais extracelulares e transdução entre as células vegetais. Especificamente para interação plantas e patógenos, esses são ainda fenômenos poucos compreendidos e sua elucidação representa uma importante tarefa da fitopatologia (NIMCHUK et al., 2001). O conhecimento do comportamento das enzimas antioxidativas e das PR-proteínas envolvidas com os mecanismos de defesa ajudam a entender como as plantas reagem frente ao ataque de agressores.

## **6 - Aspectos gerais do silício e sua ação nas plantas**

O silício (Si) é um elemento com propriedades físicas e elétricas de um semi-metal, desempenhando, no reino mineral, um papel cuja importância pode ser comparável ao do carbono nos reinos vegetal e animal. É o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, superado apenas pelo oxigênio. Esse elemento ainda não foi considerado como nutriente para as plantas, porque a sua função ainda não foi esclarecida (EPSTEIN, 1999).

O silício é encontrado apenas em formas combinadas, como a sílica e minerais silicatados. Os silicatos são sais nos quais a sílica é combinada com oxigênio e outros elementos como Al, Ca, Mg, Na, K e Fe em mais de 95% das rochas terrestres, meteoritos, em todas as águas e na atmosfera na forma de pó silicoso vegetal e animal (SAVANT; DATNOFF; SNYDER, 1997).

Um número grande de materiais tem sido utilizado como fonte de Si para as plantas: escórias de siderurgia, wollastonita, subprodutos da produção de fósforo elementar, silicato de cálcio, silicato de sódio, cimento, termofosfato, silicato de magnésio (serpentinito) e silicato de potássio. A wollastonita é um silicato de cálcio muito empregado como fonte de Si em experimentação (KORNDÖRFER; PEREIRA; CAMARGO, 2003).

Os silicatos têm no solo, comportamento similar ao dos carbonatos de cálcio e magnésio, sendo capazes de elevar o pH, neutralizar o Al trocável e estão associados ainda ao aumento da disponibilidade de Si solúvel e dos teores de Ca e Mg trocáveis, o que promove maior saturação por bases e menor saturação por Al (EPSTEIN, 1999; SAVANT et al., 1999).

Existe grande diversidade de fontes de Si usadas na agricultura, porém as normalmente pesquisadas são os silicato de cálcio, metassilicatos de sódio e potássio, além do ácido silícico, com efeitos semelhantes (BÉLANGER et al., 1995). Além dos produtos especialmente desenvolvidos para aplicações foliares, termofosfatos e diferentes escórias industriais são aplicadas ao solo e adicionam significativas quantidades de silício, juntamente com outros nutrientes (LIMA FILHO; LIMA; TSAI, 1999).

Apesar do Si não ser considerado um nutriente essencial para a maioria das plantas, possui efeito reconhecido em muitas delas e o potencial benéfico tem sido extensivamente estudado. O papel do Si nas plantas é reconhecido por aliviar os estresses bióticos e

abióticos, sendo este mecanismo traduzido na proteção contra estresses. Este é o único elemento mineral que confere resistência às plantas e a múltiplos fatores de estresse (EPSTEIN, 1999) e, também, é considerado o único elemento que não causa danos às plantas quando acumulado em excesso.

Na planta, o Si concentra-se nos tecidos de suporte, do caule e nas folhas, podendo ser encontrado em pequenas quantidades nos grãos. Em geral, o conteúdo médio de Si das raízes é menor se comparado com o caule e folhas. Já em alguns casos, como por exemplo, a soja, o teor de Si na raiz é maior do que nas folhas (OLIVEIRA; CASTRO, 2002).

Com relação ao acúmulo de Si, as plantas podem ser classificadas como acumuladoras e não-acumuladoras. Em geral, são consideradas plantas acumuladoras de Si, aquelas que possuem teor foliar acima de 1%, e as não acumuladoras são plantas com teor foliar de Si menor que 0,5% (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001). Postula-se a essencialidade agrônômica do Si, principalmente em plantas acumuladoras, em vista dos diversos benefícios advindos com a nutrição deste elemento. O Si pode estimular o crescimento e a produção vegetal através de várias ações indiretas, como o aumento no teor de clorofila; maior massa foliar (fresca e seca) específica; atraso na senescência; decréscimo na suscetibilidade ao acamamento; maior rigidez estrutural dos tecidos; proteção contra estresses bióticos e abióticos, como a redução da toxidez de Al, Mn, Fe, Cd, B e Na; interações positivas com fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos; aumento na proteção contra herbívoros, incluindo os insetos fitófagos e principalmente, diminuição na incidência de inúmeros fungos patogênicos (EPSTEIN, 1994; MARSCHNER, 1995; DATNOFF; DEREN; SNYDER, 1997).

Muitas plantas de culturas importantes são reconhecidas como não acumuladoras e são incapazes de transportar Si através das raízes, mesmo quando a concentração deste elemento no solo é alta e, portanto falham em acumular grandes quantidades de Si na parte

aérea. Nessas plantas o Si desempenharia um papel indireto agindo sobre enzimas degradadoras de espécies reativas de oxigênio, e também enzimas degradadoras de parede celular de patógenos (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001).

Em arroz, postula-se a essencialidade agrônômica do Si, em vista dos diversos benefícios advindos com a nutrição deste elemento. Estes benefícios incluem o aumento no crescimento e na produção, interações positivas com fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos, aumento na resistência a estresses bióticos (doenças e pragas) e abióticos (seca, salinidade, acamamento) e aumento na produtividade em solos problemáticos, como os solos orgânicos e solos ácidos com níveis tóxicos de Al, Fe e Mn (SAVANT et al., 1997). Em plantas de arroz, a suplementação de Si proporcionou um aumento na produção e na massa individual das sementes, diminuição da esterilidade e do teor de Mn e maior taxa fotossintética (MATOH; MURATA, TAKAHASHI, 1991; PERSHIN; PERSHINA; EGORINA, 1995). Em pepineiros, Adatia e Besford (1986) observaram vários efeitos devido à adição de Si ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) à solução nutritiva hidropônica, o aumento no teor de clorofila, maior massa foliar (fresca e seca) específica, atraso na senescência e aumento da rigidez das folhas maduras, as quais mantinham-se mais horizontais. A melhor arquitetura foliar permite maior penetração de luz solar, maior absorção de  $\text{CO}_2$  e diminuição da transpiração excessiva, o que permite o incremento da taxa fotossintética (MA; YAMAJIN, 2006).

Em algodoeiro, a concentração de Si na fibra aumenta durante a fase de alongamento, alcançando um valor máximo no início da formação da parede secundária, sugerindo que o elemento possa ter um papel na formação e alongamento da fibra e, possivelmente, no desenvolvimento desta parede. Pesquisas indicam, que a adubação com Si via solo também pode promover crescimento mais rápido do algodoeiro. Além disso, pode aumentar o número total de capulhos e ramos frutíferos, tamanho de capulhos e

porcentagem de fibra (LIMA FILHO, 2001). Boylston et al. (1990) mencionaram que esse elemento foi importante para o aumento da resistência das fibras de algodão ao formar complexos com a pectina e a calose.

Ferreira (2008) estudando os efeitos do metassilicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) via solução nutritiva em casa de vegetação, através de análises bioquímicas, qualidade de fibra e produtividade do algodoeiro, observou que os teores de Si na planta, raiz e folha cresceram com o aumento das doses utilizadas; que o Si promoveu maior resistência ao estresse hídrico, maior vigor e tolerância a doenças; houve uma diminuição da deposição de açúcar na fibra, indicando uma diminuição da preferência do pulgão *Aphis gossypii* Glover (1877). Foi constatado aumento na quantidade de fotossíntese realizada pela cultura, assim como a diminuição na perda de água através da transpiração. A atividade da catalase foi acelerada e correlacionada com aumento dos teores de proteína e as doses de Si durante as 11 semanas avaliadas.

### **6.1 - O silício na ativação dos mecanismos de defesa vegetal**

A descoberta do Si como um composto capaz de minimizar os sintomas de doenças em plantas desperta o interesse pelo uso no controle. Aliado a este fato o Si parece não influenciar diretamente os patógenos, não sendo considerado um fungicida e/ ou bactericida, portanto não causa pressão de seleção a linhagens mais resistentes. Através do uso de uma fonte rica de silicato prontamente disponível (ex. palhada de gramíneas) ou via fornecimento ao solo ou folha, o Si contribui para o aumento do grau de supressão a patógenos, podendo aumentar significativamente a produção e a qualidade do produto final, o que torna seu uso viável do ponto de vista técnico e ecológico (MARTINATI, 2008)

As propriedades de ativadores de resistência sistêmica adquirida e da resistência estimulada pelo Si foram comparadas por Fawe et al. (2001), ficando evidente a

semelhança entre os efeitos da aplicação do Si e do uso de indutores de resistência na indução de reações de defesa em plantas. Fawe et al. (1998) relatam que o papel protetor do Si pode ser semelhante em mono e dicotiledôneas, sendo que nestas últimas o modo de ação do Si na resistência ainda não foi bem esclarecido, embora sugira classificar o Si como mediador de resposta de defesa similar ao da resistência sistêmica adquirida.

Há evidências de que o envolvimento dos silicatos na indução de resistência pode ocorrer pela participação do próprio Si, fortificando estruturas da parede celular, com aumento da lignificação, tornando-as menos acessíveis às enzimas de degradação; ativação de mecanismos específicos de defesa como a produção de fitoalexinas (MENZIES et al., 1991; FAWÉ et al., 2001); e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994).

Os estudos de Si no controle de doenças tiveram início com monocotiledôneas, pois estas absorvem grandes quantidades deste elemento. As doenças do arroz, por exemplo, são as mais eficientemente controladas pelo suprimento de Si às plantas. Porém, o interesse pelo estudo em patossistemas envolvendo dicotiledôneas surgiu na segunda metade do século passado, centralizando-se principalmente nos estudos com oídios (BÉLANGER et al., 1995; DATNOFF et al., 1997). Em videira e pepineiro, dicotiledôneas não-acumuladoras de Si, observou-se o acúmulo de Si na superfície das folhas pulverizadas, impedindo o crescimento das hifas de *Uncinula necator* Schwein e *Sphaerotheca fuliginea* Schlecht et Fr, respectivamente (SAMUELS et al., 1991; BOWER; MENZIES; EHRET, 1992). Outros trabalhos atribuem a redução da intensidade da doença a mecanismos de indução de resistência, como observado em plantas de pepino inoculadas com *S. fuliginea* e *Pythium* spp. (Swartz.) onde houve a produção de compostos fenólicos, quitinases, peroxidases e polifenoxidases em plantas suplementadas com 100 mg Kg<sup>-1</sup> de Si na forma de silicato

de potássio, em solução nutritiva (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994; FAWÉ et al., 1998).

Pereira et al. (2009) estudaram o efeito da aplicação foliar de silicato de potássio ( $K_2SiO_3$ ) (pH 10,5),  $K_2SiO_3$  (pH 5,5) e acibenzolar-S-metil (ASM) na severidade da ferrugem da soja e na potencialização da atividade de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases, polifenoloxidasas, lipoxigenases e fenilalanina amônia-liases. Foi constatado que houve uma menor severidade da doença para os tratamentos ( $K_2SiO_3$ ) independente do pH e do ASM, no entanto, as atividades enzimáticas não foram potencializadas.

Moraes et al. (2009) observaram a redução da incidência e severidade da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com a utilização de silicato de cálcio e sulfato de cobre, respectivamente. Esses tratamentos causaram decréscimos nos teores de K, Mg, S, Zn e Ca e aumento no teor de Si.

Existem poucos estudos relacionados ao uso de Si no controle de doenças bacterianas menos ainda com plantas não acumuladoras. Dannon e Wydra (2004) verificaram que a incidência de murcha causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.), tanto suscetíveis quanto moderadamente resistentes, foi significativamente reduzida com adição de Si na solução nutritiva. Correlações negativas entre o conteúdo de Si na raiz e o número de bactérias na parte mediana do caule sugeriram que houve indução de resistência. Este foi o primeiro relato do efeito de Si em uma doença bacteriana e em uma planta não-acumuladora. Diogo e Wydra (2007) testando diferentes genótipos de tomateiro, observaram que a incidência da murcha-bacteriana em genótipos moderadamente resistente (King Kong 2) e resistente (Hawaii 7998), tratados com silicato de potássio foi reduzida em 38,1% e 100%, respectivamente. Análises imuno-histoquímicas sugeriram uma indução

de resistência basal em nível de parede celular após tratamento com Si envolvendo mudanças na estrutura de polissacarídeos pécticos.

Brancaglione et al. (2009) avaliaram o efeito da argila silicatada *in vitro* e em aplicações foliares de modo preventivo e curativo em mudas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) e observaram que a argila em diferentes doses inibiu a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye *in vitro* e os sintomas da doença no tratamento curativo.

Cazorla et al. (2006) não verificaram efeito isolado da aplicação do Si no controle da necrose apical bacteriana da mangueira (*Mangifera indica* L.) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall. No entanto, Martinati et al. (2007) constataram efeito positivo da aplicação ao solo de soluções de metassilicato de sódio na redução de sintomas da bacteriose causada pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* Schaad et al. em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.).

Em casa de vegetação, Ferreira (2009) testou diferentes doses de silicato de cálcio aplicadas ao solo para controle da mancha-aquosa do meloeiro, causada pela bactéria *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al. Foi constatado que 3,0 g de SiO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> de solo promoveu alterações significativas nos atributos químicos do solo, na nutrição e desenvolvimento da planta, reduziu significativamente a incidência, o índice de doença e a área abaixo da curva de progresso da doença e aumentou o período de incubação. Com relação às atividades enzimáticas, apenas algumas isoformas da SOD foram induzidas.

Tendo em vista a crescente importância da mancha-angular do algodoeiro para as áreas produtoras, principalmente na Região do Cerrado Brasileiro e a carência de conhecimentos básicos que dêem suporte ao controle dessa doença, o presente trabalho teve como objetivos: estudar a variabilidade de isolados de *Xcm* com base em



características bioquímicas, fisiológicas e moleculares, e determinar o efeito do Si no controle dessa doença quais mecanismos estariam envolvidos na indução de resistência.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDO-HASAN, M.; KHALIL, H.; DEBIS, B., MIRALI, N. Molecular characterization of syrian races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 90, n. 3, p. 431- 439, 2008.

ABRAPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO.

Exportações e importações brasileiras de algodão. Disponível em:

<<http://www.abrapa.com.br/estatisticas/ab/462577736918528.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

ADATIA, M. H.; BESFORD, R. T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, London, v. 58, n. 3, p. 343-351, 1986.

AGARIE, S.; AGATA, W.; KAUFMAN. P. B. Involvement of silicon in the senescence of rice leaves. **Plant Production Science**, Limerick, v. 1, n. 2, p.104-105, 1998.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. California: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and theirs relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 306-318, 2009.

ALMAGRO, L.; ROS, L. V. G.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; BARCELÓ, A. R.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.

AMBORABÉ, B-E.; BONMORT, J.; FLEURAT-LESSARD, P.; ROBLIN, G. Early events induced by chitosan on plant cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n.9, p. 2317-2324, 2008.

AZEVEDO, S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para sua quantificação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2000.

BACH, E. E.; BARROS, B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivated conidial suspension. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 7-8, p. 411-418, 2003.

BARRETO, A. L. H.; VASCONCELOS, I. M.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. M.; MATOS, T. E.; ELOY, Y. R. G.; FERNANDES, C. F.; TORRES, D. C.; FREIRE-FILHO, F. R.; FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, J. T. A. Infection process and host defense response in compatible and incompatible in interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloesporioides*. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 168, n. 2, p. 193-203, 2007.

BAYLES, M. B., VERHALEN, L. M. Bacterial blight reactions of sixty-one Upland cotton cultivars. **The Journal of Cotton Science**, v. 11, p. 40-51, 2007.

BAYSAL, O.; TURGUT, C.; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.

BATISTA, C. **Tratado de fitopatologia**. Recife: Mimiografado, 1953. 970p.

BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; MONOT, C.; SILUÉ, D. Fitogard® (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 6, p. 417-425, 2000.

BÉLANGER, R. R.; BOWEN, P.A.; EHRET, D.L.; MENZIES, J. G. Soluble silicon - its role in crop and disease management of greenhouse crops. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n. 4, p. 329-336, 1995.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.

BIAN, S., JIAN, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 264-270, 2009.

BIRD, L. S.; BRINKERHOFF, L. A.; DAVIS, R. G. Bacterial blight. In: WATKINS, G. M. (Ed.) **Compendium of cotton diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1981. p. 25-28.

BITANCOURT, A. A. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Secção de Phytopathologia durante os anos de 1931e 1932. **Archivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 8, p.185-196, 1934.

BOWER, P.; MENZIES, J.; EHRET, D. Soluble silicon spray inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 6, p. 906-912, 1992.

BOYLSTON, E. K., HEBERT, J. J., HENSARLING, T. P., BRADOW, J. M.; THIBODEAUX, D. P. Role of silicon in developing cotton fibers. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 13, n. 1, p. 131-148, 1990.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Aberystwyth: CAB International, 1986. 332p.

BRANCAGLIONE, P.; SAMPAIO, A. C.; FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M.; FUMIS, T, F. Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *in vitro* e em mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 718-724, 2009.

BRINKERHOFF, L. A. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its Relation to Control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 8, p. 85-110, 1970.

BROWN, J. K. M. Surveys of variation in pathogen population and their applications to disease control. In: JONES, C. (Ed). **The Epidemiology of Plant Disease**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.73-102.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p

BROWN, J. K. M. Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G; KAYE, B. (Eds.). **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 81-115.

- CALDWELL, D. R. **Microbial physiology and metabolism**. 2. ed. Estados Unidos: Star Publishing Company, 2000. 404p.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO A. Q. **Doenças do algodoeiro: diagnose e controle**. Cuiabá: UFMT, 2000. 47 p.
- CASSETARI NETO, D.; MESQUITA NETO, D. R.; SANTOS, E. N. Avaliação de genótipos de algodão quanto a reação as principais doenças no Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2001. p. 528-533.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicios*a mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 5, p. 729–738, 2007.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; JUNIOR, P. M. R.; PEREIRA, R. B.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis pernicios*a suspension. **Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 90, n. 2, p. 271-278, 2008
- CAZORLA, M. F.; ARREBOLA, E.; OLEA, F.; VELASCO, L.; HERMOSO, J. M.; PÉREZ-GARCIA, A.; TÓRES, J. A.; FARRÉ, J. M.; VICENTE, A. Field evaluation of treatments for the control of the bacterial apical necrosis of mango (*Mangifera indica*) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 116, n. 4, p. 279-288, 2006.
- CHANG, S. J. TZENG, D. D. S.; LI, C. C. Effect of silicon nutrient on bacterial blight resistance of rice (*Oryza sativa* L.) In: MATOH (Ed.) Kyoto: Press-Net, 2002, p.31-33.
- CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 236-242, 1994.
- CIA, E.; ARAÚJO, A. E. **Doenças do algodoeiro**. In: DOENÇAS DO ALGODOEIRO NO CERRADO DE MATO GROSSO. Rondonópolis: FUNDAÇÃO MT/EMBRAPA, 1999. p. 100-112. (Mato Grosso liderança e competitividade. Boletim, 3).

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Eds.). **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Patafos, 1999. p. 121-132.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; CHIAVEGATO, E. J.; PIZZINATTO, M. A.; ZIMBACK, L.; BORTOLETTO, N.; PAULO, E. M.; PETTINELLI JÚNIOR, A.; SILVA, M.A.; BOLONHEZI, D.; VASCONCELOS, A. S. A. Comportamento de cultivares de algodoeiro selecionadas em outras regiões, diante de doenças que ocorrem no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 1., 1997, Fortaleza. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA/CNPA, 1997. 648p.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; PIZZINATTO, M. A.; BORTOLETTO, N. Uma escala para classificação da resistência de cultivares a doenças do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 1, p. 28-34, 2002.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 42-52.

CIPOLLINI, D. F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, Berlin, v. 131, n. 4, p. 514-520, 2002.

COLLINGE, D. B. Cell wall appositions: the first line of defence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 351–352, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira 2009/2010**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 18 abr. 2010.

COSTA, V. S. O.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 182-189, 2001.

- DANNON, E.; WYDRA, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 5, p. 233-243, 2004.
- DATNOFF, L. E.; DEREN, C. W.; SNYDER, G. H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. **Crop Protection**, Guildford, v. 16, n. 6, p. 525-531, 1997.
- DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, V. F. J. The use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-183.
- DIOGO, R.V.C.; WYDRA, K. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polisaccharide structure. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 70, n. 4-6, p. 120-129, 2007.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.
- EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings Natural Academy Science**, [S.l.], v. 91, p. 11-17, 1994.
- EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, p. 893-897, 2007.
- EXLEY, C. Silicon in life: A bioinorganic solution to bioorganic essentiality. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 69, n. 3, p. 139-44, 1998.
- FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL; W., MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 1-6, 2005.
- FAWE, A; MENZIES, J. G.; CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in agriculture: studies in plants in plant science**. v. 8. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 159-169.

- FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 396-401, 1998.
- FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal Plant of Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 10, p. 1040-1048, 2006.
- FERREIRA, H. A. Si no controle da mancha-aquosa em meloeiro (*Cucumis melo* L.). 2009. 82 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2009.
- FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; Duarte, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 677–700, 2007.
- FERREIRA, S. M. O efeito do Si na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.): aspectos bioquímicos, qualidade de fibra e produtividade. 2008. 67 p. **Tese** (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 09 abr. 2010.
- FREIRE, E. C.; COSTA, J. N.; ANDRADE, F. P. **Recursos genéticos e melhoramento do algodão no Nordeste do Brasil**. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds.). Recursos genéticos e melhoramento do algodão no Nordeste do Brasil, Petrolina, PE: Embrapa semi-árido, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em <<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 05 mai 2010.
- FREIRE, R. M. M. **Cultivo do algodão herbáceo na agricultura familiar: subprodutos**. 2. ed. 2006. Versão eletrônica. ISSN 1678-8710 Set/2006. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fonteshtml/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar\\_2ed/subproduto.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fonteshtml/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar_2ed/subproduto.html). Acesso em: 05 jan. 2010.
- GONDIM, D. M. C.; BELOT, J. L.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Estado do Paraná**. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 1996. 104 p. (Boletim Técnico, 31).



HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R. Antioxidants and regulation of defense. **Physiology and Molecular of Plant Pathology**, London, v. 66, n. 2, p. 211-212, 2005.

HODSON, M. J.; WHITE, P. J.; MEAD, A.; BROADLEY, M. R. Phylogenetic Variation in the Silicon Composition of Plants. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 4, p. 1027-1046, 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUANG, X.; ZHAI, J.; LUO, Y.; RUDOLPH, K. Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 4, p. 461- 469, 2008.

INGRI, N. Aqueous silicic acid, silicates and silicate complexes In: BENDZ, G.; LINDQUIST, I. (Eds.). **Biochemistry of silicon and related problems**. Plenum: New York, 1978. p. 3-50.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **SIDRA 2009**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 mai. 2010.

ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; AMARAL, D. R.; RESENDE, M. L. V. Extratos vegetais , fertilizantes e ASM no controle da mancha-angular do algodoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, suplemento, p. 268, 2007 (Resumo 387).

ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; VILAS-BÔAS, C. H.; SOUZA, J. T. Rizobactérias no controle da mancha-angular do algodoeiro. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 149-156, 2008.

JEANDET, P.; DOILLET-BREUIL, A. C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADIAN, M. Phytoalexins from vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, 2002.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A.C. **Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira**. Uberlândia: EDUFU, 2003. 142p.

KHANAM, N. N.; KIHARA, J.; HONDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ARASE, S. Studies on red light-induced resistance of broad bean to *Botrytis cinerea*: I. Possible production of suppressor and elicitor by germinating spores of pathogen. **Journal of General Plant Pathology**, Sapporo, v. 71, n. 1-2, p. 285-288, 2005.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H.; CAMARGO, M. S. **Silicatos de cálcio e magnésio na agricultura**. Uberlândia: UFU – Instituto de Ciências Agrárias, 2003. (Boletim Técnico n.1).

LIMA, E. F.; ARAÚJO, A. E. O perigo da mancha-angular. Grupo cultivar de publicações. **Revista cultivar grandes culturas**, Pelotas, n. 18, p.64, 2000.

LIMA FILHO, O. F. **O Si é um fortificante e antiestressante natural para as plantas**. Dourados, 2001. Disponível em: <<http://www.cpa0.embrapa.br/portal/artigos2htm>>. Acesso em: 21 mai. 2010.

LIMA FILHO, O. F.; LIMA, M. T. G.; TSAI, S. M. O Si na agricultura. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 87, p. 1-7, 1999.

LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. A.; FONSECA, T. A. P. S.; CARVALHO, J. G. Quantificação da ferrugem asiática e aspectos nutricionais de soja suprida com Si em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.36, n.1, p. 51-56, 2010.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: Diagone e controle**. Brasília: EMBRAPA - CNPH, 1997. 70 p.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* cultivars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR- based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in Agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 17-39.

MA, J.F.; YAMAJI N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends Plant Science**. Oxford, v. 11, n. 8, p. 392-397, 2006.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, n. 2, p. 163-175, 1998.

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

MARTINATI, J. C. **Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com Si**. 2008. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e Ambiente.) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/>>. Acesso em: 04 abr. 2010.

MARTINATI, J. C.; LACAVALA, P. T.; MIYASAWA, S. K. S.; GUZZO, S. D.; AZEVEDO, J. L.; TSAI, S. M. Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por meio de aplicação de benzotiadiazole e Si. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1083-1089, 2007.

MATOH, T.; MURATA, S.; TAKAHASHI, E. Effect of silicate application on photosynthesis of rice plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 248-251, 1991.

- MENZIES, J. G.; EHRET, D. L.; GLASS, A. D. M.; HELMER, T.; KOCH, C.; SEYWERT, F. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 84-99, 1991.
- MIRANDA, J. E.; SUASSUNA, N. D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 47p. (Circular Técnica, 76).
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 162, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MONOT, C.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**, Orlando, v. 24, n. 1, p. 75-81, 2002.
- MORAES, S. R. G., POZZA, E. A., POZZA, A. A. A., CARVALHO, J. G.; SOUZA, P. E. Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de Si e cobre. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 283-291, 2009.
- NIMCHUK, Z.; ROHMER, L.; CHANG, J. H.; DANGL, J. L. Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 4, n. 2, p. 288-294, 2001.
- NUNES, M. P.; BOLOGNINI, V.; MEHTA, Y. R.; ROSATO, P. H.; CIA, M. A.; GUIAR, E.; MEHTA, A.; PIZZINATO, Y.; CHIAVEGATO, E. J. Variabilidade genética entre os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 105-109, 2009.
- ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, Varna, v. 27, n. 1-2, p. 101-109, 2001.
- OLIVEIRA, L. A.; CASTRO, N. M. Ocorrência de Sílica nas Folhas de *Curatella americana* L. e de *Davilla elliptica* St. Hil. **Revista Horizonte Científico**, 2002>. Acesso em: 05 abr. 2010.

- PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. Aplicação foliar de Si na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2009.
- PERSHIN, B. M.; PERSHINA, A. N.; EGORINA, L. M. Silicon and rice production in the Primorskii region. **Agrokimiya**, Moscow, v. 10, n. 1, p. 68-74, 1995.
- RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS J.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v. 50, p. 665-677, 2000.
- RESENDE, M. L. V.; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F. R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, 2007.
- REUVENI, R.; DOR, G.; RAVIN, M.; REUVENI, M.; TUZUN, S. Systemic resistance against *Sphaeroteca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 355-361, 2000.
- RICHETTI, A.; MELO FILHO, G. A. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. cap.1, p. 13-34.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Imprensa Universitária UFV. 2005. 283p.
- ROMEIRO, R. S. **Fundamentos da bacteriologia de plantas**. Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 1988. 50p.
- ROMEIRO, R. S.; VIEIRA JUNIOR, J. R. H. Macromolecules released by a plant growth-promoting *Rhizobacterium* as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 2, p. 120-123, 2005.

ROMEIRO, R. S.; PEREZ, F. S.; OLIVEIRA, J. R.; PELOSO, M. J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 1-5, 1993.

SALAHEDDIN, K.; VALLUVAPARIDASAN, V.; LADHALAKSHMI, D.; VELAZHAHAN, R. Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. **Plant Protection Science**, Ohio, v. 46, n. 2, p. 41–50, 2010.

SAMUELS, A. L.; GLASS, A. D. M.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Distribution of silicon leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 1, p. 140-146, 1991.

SAVANT, N. K.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H. Depletion of plantavailable silicon in soil: a possible cause of declining Rice yields. **Communications in Soil Science and Plant Analyses**, New York, v. 28, n. 13-14, p. 1245-1252, 1997.

SAVANT, N. K.; KORNDÖRFER, G. H.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H. Silicon nutrition and sugarcane production: a review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, n. 22, p. 1853-1903, 1999.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; TROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smithii, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 494-518, 2005.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; TROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Emended classification of

xanthomonad pathogens on *citrus*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 690-695, 2006.

SCHMIDT, R. E.; ZHANG, X.; CHALMERS, D.R. Response of photosynthesis and superoxide dismutase to silica applied to creeping bentgrass grown under two fertility levels. **Journal of plant nutrition**, New York, v. 22, n. 11, p. 1763-1773, 1999.

SCHNATHORST, W. C. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton Plants and its significance in dissemination of the pathogen on seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, n. 8, p. 1009-1011, 1964.

SILVA, I. T.; RODRIGUES, F. A.; OLIVEIRA, J. R.; PEREIRA, S. C.; ANDRADE, C. C. L.; SILVEIRA, R. P.; CONCEIÇÃO, M. M. Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 253-262, 2010.

SILVA NETO, E. B.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, Suplemento, p. S340, 2003 (Resumo).

SIQUERI, F. V. **Controle químico da mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro**. Rondonópolis: Fundação MT/ EMBRAPA, 2005. p. 100-112. (Mato Grosso Liderança e competitividade. Boletim, 3).

SOAVE, J.; MORAES, S. A. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 192-259.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological of agricultural Research**, Praha, v. 4, p. 193-199, 2000.

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L. G.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. **Manejo de doenças do algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 48 p. (Circular Técnica, 97).

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 1, p. 69-77, 2004.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M.; PEC, P.; LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon spp.* and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 1-3, p. 22-32, 2006.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 373-378, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, n.1, p. 135-162, 2006.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B., KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VERMA J. P.; SINGH, R. P. Recent studies on the bacterial diseases of fiber and oil seed crops in India. In: RAYCHAUHRI S.P.; VERMA J.P. (Ed). **Current Trends in Plant Pathology**, India: Luknow University, 1974. p. 134-145.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2002.

WATKINS, G. M. **Compendium of cotton diseases**. Saint Paul: APS, 1981. 87p.



WEN, P-F.; CHEN, J-Y.; KONG, W. F.; PAN, Q-H.; WAN, S-B.; HUANG, W-D.

Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry.

**Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 5, p. 928-934, 2005.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. Manejo sustentável na agricultura. **Informações**

**agronômicas**, Piracicaba, n. 116, p. 1-32, 2006.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl

jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest**

**Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 253-262, 2005.

ZACHOWSKI, A.; EBRAHIM-NESBAT, F.; RUDOLPH, K. Effect of continuous

darkness on susceptible cotton cotyledons. In: KLEMENT, Z. (Ed.). **Plant Pathogenic**

**Bacteria**. Budapest: Akadémiai Kiado, 1989. p. 173-178.

ZANDONÁ, C.; MEHTA, Y. R.; SCHUSTER, I.; ALVES, P. F. R.; BOMFETI, C. A.;

BIBANCO, K. R. P.; SILVA, R. B.; LOPES, L. P. Mecanismo genético da resistência com

três cultivares de algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia**

**Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 647-649, 2005.

## Capítulo II

---

### **Caracterização de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* causando mancha-angular em algodoeiro no Brasil**

1           **CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* CAUSANDO**  
2                           **MANCHA-ANGULAR EM ALGODOEIRO NO BRASIL**

3

4   **J.C. Oliveira<sup>1</sup>, G.M.R. Albuquerque<sup>1</sup>, A.S. Xavier<sup>1</sup>, R.L.R. Mariano<sup>1\*</sup>, N.D.**  
5   **Suassuna<sup>2</sup>, E.B. Silveira<sup>3</sup>**

6

7   <sup>1</sup> *UFRPE/ Recife – Deptº de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife, PE - Brasil.*

8   <sup>2</sup> *Embrapa Algodão – 58428-095, Campina Grande, PB - Brasil.*

9   <sup>3</sup> *UFRPE/ – Recife – Deptº de Biologia/Área de Microbiologia, 52171-900, Recife, PE - Brasil.*

10

11   \* *Autor para correspondência: [rrmbac@gmail.com](mailto:rrmbac@gmail.com)*

12   *Fax: (55)81 3320-6205*

13

14           **CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, CAUSAL**  
15                           **AGENT OF COTTON BLIGHT IN BRAZIL**

16

17   **SUMMARY:** The variability of a population formed by 100 *Xanthomonas citri* subsp.  
18   *malvacearum* (*Xcm*) strains obtained from plants showing typical symptoms of bacterial  
19   blight at commercial cotton fields in the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul  
20   and Bahia, Brazil, was analyzed based upon genetic and phenotypic characteristics. The  
21   enzymes amylase, lipase, cellulase and the polysaccharide levan were produced by all *Xcm*  
22   strains while the caseinase was only produced by 20 strains. All strains induced  
23   hypersensitivity reaction in tomato leaves. The 100 strains were sensitive to copper  
24   oxychloride (1500 mg l<sup>-1</sup>), copper hydroxide (1614 mg l<sup>-1</sup>), oxytetracycline (600 mg l<sup>-1</sup>),  
25   oxytetracycline (90 mg l<sup>-1</sup>) + tribasic copper sulfate (1500 mg l<sup>-1</sup>) and oxytetracycline (76,6  
26   mg l<sup>-1</sup>) + streptomycin sulfate (367,2 mg l<sup>-1</sup>), but resistant to kasugamycin (60 mg l<sup>-1</sup>).  
27   Among the eighteen tested antibiotics the bacterial strains presented variable reaction in  
28   relation to: nalidixic acid, amoxicillin, azithromycin, bacitracin, eritromicin, kanamycin,  
29   pefloxacin, tobramycin e vancomycin. The cluster analysis of the rep-PCR combined data  
30   showed the formation of five groups at 70% similarity level. Group I contained 98 strains,  
31   including the reference strain *Xcm* IBSBF1733, group II contained only two strains from  
32   Bahia and the other three groups included strains of *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv.  
33   *mangiferaeindicae* and *X. axonopodis* pv. *spondiae* used for comparison. None of the rep-  
34   PCR *primers* was able to separate strains in relation to cotton cultivar or state of origin.  
35   Thus based on the analyzed characteristics we conclude that this population presents low  
36   genetic and phenotypic variability.

37   **Key words:** variability, antibiotics, copper based products, enzymes, *Gossypium hirsutum*,  
38   rep-PCR.

39 **SUMÁRIO:** A variabilidade de uma população de 100 isolados de *Xanthomonas citri*  
40 subsp. *malvacearum* (*Xcm*), oriundos de plantas com sintomas típicos de mancha-angular  
41 em áreas produtoras de algodoeiro dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul  
42 e Bahia, Brasil, foi analisada com base em características fenotípicas e genéticas. As  
43 enzimas amilase, lipase e celulase e o polissacarídeo levana foram produzidos por todos os  
44 isolados de *Xcm*, enquanto a caseinase foi produzida apenas por 20 isolados. Todos os  
45 isolados induziram reação de hipersensibilidade em folhas de tomateiro. Os 100 isolados  
46 foram sensíveis a oxicloreto de cobre ( $1500 \text{ mg l}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $1614 \text{ mg l}^{-1}$ ),  
47 oxitetraciclina ( $600 \text{ mg l}^{-1}$ ), oxitetraciclina ( $90 \text{ mg l}^{-1}$ ) + sulfato tribásico de cobre ( $1500$   
48  $\text{mg l}^{-1}$ ) e oxitetraciclina ( $76,6 \text{ mg l}^{-1}$ ) + sulfato de estreptomicina ( $367,2 \text{ mg l}^{-1}$ ), e  
49 resistentes a casugamicina ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ). Dentre os 18 antibióticos testados, os isolados  
50 bacterianos apresentaram reação variável a nove: ácido nalidíxico, amoxicilina,  
51 azitromicina, bacitracina, eritromicina, kanamicina, pefloxacina, tobramicina e  
52 vancomicina. Rep-PCR (REP, ERIC e BOX) revelou a formação de cinco grupos ao nível  
53 de 70% de similaridade, sendo o grupo I constituído de 98 isolados, incluindo o isolado  
54 referência de *Xcm* IBSBF1733, o grupo II, formado apenas por dois isolados oriundos da  
55 Bahia e os três outros grupos por isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv.  
56 *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* utilizados para comparação. Não existiu  
57 variação genética entre os isolados em relação a cultivar de algodoeiro e local de origem.  
58 Conclui-se que, com base nas características analisadas, a população estudada apresentou  
59 baixa variabilidade fenotípica e genotípica.

60 *Palavras-chave:* variabilidade, antibióticos, cúpricos, enzimas, *Gossypium hirsutum*, rep-  
61 PCR.

## 62 INTRODUÇÃO

63 A mancha-angular do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) causada por  
64 *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad *et al.* (*Xcm*) é uma das doenças  
65 mais importantes para essa cultura no mundo (Bayles e Verhalen, 2007). No Brasil, o  
66 primeiro relato da doença foi realizado por Bitancourt durante os anos de 1931 e 1932 no  
67 Instituto Biológico de São Paulo (Bitancourt, 1934). Segundo Chaves Batista (1953)  
68 ocorria em todo o Brasil sobre o algodoeiro herbáceo embora fosse assinalada em  
69 algodoeiro arbóreo nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. A partir de 1990,  
70 vem se tornando potencialmente destrutiva quando as condições ambientais são favoráveis  
71 (Suassuna *et al.*, 2006).

72 Os sintomas da mancha-angular caracterizam-se nas folhas como lesões angulares  
73 delimitadas pelas nervuras secundárias e terciárias, inicialmente de aspecto encharcado,  
74 tornando-se pardas posteriormente, podendo ocorrer coalescência e rasgadura do limbo  
75 foliar. Nas folhas cotiledonares, as manchas são arredondadas com aspecto encharcado.  
76 Em caso de alta severidade, além da redução da área foliar, é comum a infecção das maçãs  
77 (Suassuna *et al.*, 2006).

78 No manejo da mancha-angular, as pesquisas têm sido direcionadas principalmente  
79 para a obtenção de variedades resistentes (Zandoná *et al.*, 2005), sendo o conhecimento da  
80 variabilidade do patógeno de grande relevância. Não existem estudos atuais sobre as raças  
81 existentes no Brasil, porém no mundo, já foram descritas 32 raças patogênicas de *Xcm*  
82 (Verma *et al.*, 1974). Além dos estudos de raças de *Xcm*, testes fisiológicos e bioquímicos  
83 têm sido usados para caracterização e determinação de variação fenotípica entre espécies  
84 de *Xanthomonas* isoladas de várias plantas hospedeiras, incluindo algodão (Hayward,  
85 1964; Abdo-Hasan *et al.*, 2008). A diversidade genética baseada na presença de elementos  
86 repetitivos dispersos no genoma bacteriano (rep-PCR) também tem sido utilizada como

87 importante ferramenta para mensurar a variação dentro de populações de *Xcm* (Abdo-  
88 Hasan *et al.*, 2008). No Brasil, Menten *et al.* (2005) verificaram reação variável de cinco  
89 isolados de *Xcm* aos antibióticos penicilina G, clindamicina, cefaclor, cefalotina, cefixima  
90 e neomicina, enquanto que Nunes *et al.* (2009) observaram alta similaridade genética entre  
91 61 isolados de *Xcm* utilizando marcadores RAPD, rep-PCR e análise da região espaçadora  
92 16S-23S rDNA.

93 A variabilidade fenotípica e genética de isolados de *Xcm* do Brasil ainda não foi  
94 suficientemente estudada, principalmente considerando a introdução de novas cultivares do  
95 algodoeiro e a expansão da cultura em novas áreas. Tendo em vista a importância da  
96 mancha-angular do algodoeiro para as áreas produtoras, principalmente na Região do  
97 Cerrado e Nordeste Brasileiro, e a necessidade de conhecimentos básicos que dêem suporte  
98 ao controle dessa doença, este trabalho objetivou estudar a variabilidade de isolados de  
99 *Xcm* com base em características fenotípicas e genotípicas.

## 100 MATERIAL E MÉTODOS

### 101 Isolamento e identificação do patógeno

102 Folhas de algodoeiro apresentando sintomas típicos da mancha-angular foram  
103 coletadas em 20 áreas produtoras nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás  
104 e Bahia, Brasil. Os isolamentos foram realizados em meio Kado 523 (sacarose 10 g,  
105 extrato de levedura 4 g, caseína hidrolisada 8 g, MgSO<sub>4</sub> 0,3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g e Ágar 18 g l<sup>-1</sup>)  
106 de acordo com protocolos descritos em Mariano *et al.* (2005).

107 Para identificação dos isolados ao nível de gênero foram realizados testes de  
108 coloração de Gram, crescimento anaeróbico, produção de pigmento fluorescente em meio  
109 de King B, formação de colônias amarelas a 33°C em meio YDC e produção de urease, de  
110 acordo com protocolos de Schaad *et al.* (2001) e Mariano *et al.* (2005). Foram ainda  
111 realizados os testes de catalase, oxidase e crescimento a 40°C.

112 Os testes de patogenicidade foram realizados em plantas de algodoeiro cv. Delta  
113 Penta. Aos 25 dias após o plantio, as plantas foram inoculadas por infiltração da suspensão  
114 bacteriana com uma seringa hipodérmica de 1 ml sem agulha, sendo realizados quatro  
115 pontos de inoculação por folha. As suspensões bacterianas foram preparadas em água  
116 destilada esterilizada (ADE) a partir de cultivo em meio Kado 523, por 48 horas a 30°C,  
117 ajustando-se em fotocolorímetro para a concentração de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> ( $A_{610}=0,50$ ) e  
118 adicionando-se Tween 20 (0,05%). As plantas foram avaliadas até 18 dias após a  
119 inoculação e o patógeno foi reisolado de lesões típicas da mancha-angular, satisfazendo os  
120 Postulados de Koch. Subsequentemente, todos os isolados foram preservados em ADE,  
121 fitas de papel de filtro e por liofilização (Mariano *et al.*, 2005). Três isolados de *Xcm* da  
122 Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF1733 = NCPPB 633  
123 isolado referência, IBSBF1911 e IBSBF1954) foram incluídos como padrão de  
124 comparação.

### 125 **Produção de enzimas e polissacarídeo**

126 Os isolados de *Xcm* foram testados quanto à produção das enzimas amilase, lipase,  
127 caseinase (Mariano *et al.*, 2005) e celulase (Cattelan, 1999). A presença de halo claro ao  
128 redor das colônias da bactéria foi indicativo positivo para produção dessas enzimas. Como  
129 padrões positivos foram utilizados os isolados XccR4 de *X. campestris* pv. *campestris*, da  
130 Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE, Recife-PE, Brasil  
131 (atividades amilolítica, celulolítica e lipolítica), e UNB1216 de *X. campestris* pv. *viticola*,  
132 cedido pela Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil (hidrólise da caseína).

133 Para produção do polissacarídeo levana, o crescimento bacteriano foi semeado em  
134 meio Kado 523 suplementado com sacarose, mantido em incubadora tipo B.O.D. a 30°C e  
135 avaliado após três dias. O isolado IBSBF 451 de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, foi



136 utilizado como padrão positivo. A produção de colônias grandes, mucóides e elevadas,  
137 indicaram a produção de levana (Mariano *et al.*, 2005).

### 138 **Reação de hipersensibilidade**

139 As suspensões dos isolados de *Xcm*, preparadas conforme foi descrito para o teste  
140 de patogenicidade foram infiltradas nos espaços intercelulares da região contida entre duas  
141 nervuras laterais, na face dorsal de folhas expandidas de fumo e tomateiro. Após a  
142 infiltração, as plantas foram mantidas em ambiente com baixa umidade relativa do ar. A  
143 avaliação foi realizada 24 horas após o teste, sendo a reação de hipersensibilidade  
144 caracterizada por necrose e dessecamento do tecido da região infiltrada (Mariano *et al.*,  
145 2005). O isolado IBSBF1733 foi utilizado como padrão de comparação.

### 146 **Sensibilidade *in vitro* a cúpricos de uso agrícola e antibióticos**

147 Foram utilizados os seguintes princípios ativos e dosagens encontrados em  
148 produtos comerciais: oxiclreto de cobre (1500 mg l<sup>-1</sup>) (Fungitol Azul; Du Pont do Brasil  
149 S.A., Brazil); hidróxido de cobre (1614 mg l<sup>-1</sup>) (Kocide WDG Bioactive; Du Pont do Brasil  
150 S.A., Brazil); oxitetraciclina (600 mg l<sup>-1</sup>) (Mycoshield; Laboratórios Pfizer LTDA, Brazil);  
151 casugamicina (60 mg l<sup>-1</sup>) (Hokko Kasumin; Arysta Lifescience do Brasil Indústria Química  
152 e Agropecuária, Brazil); oxitetraciclina (90 mg l<sup>-1</sup>) + sulfato tribásico de cobre (1500 mg l<sup>-1</sup>)  
153 <sup>1</sup>) (Agrimaicin 500; Laboratórios Pfizer LTDA, Brazil); e oxitetraciclina (76,6 mg l<sup>-1</sup>) +  
154 sulfato de estreptomicina (367,2 mg l<sup>-1</sup>) (Agri-Micina PM; Laboratórios Pfizer LTDA,  
155 Brasil). Os produtos e dosagens foram selecionados com base nas recomendações para  
156 algodoeiro, culturas relacionadas ou para fitobacterioses causadas por outras espécies,  
157 subespécies ou patovares de *Xanthomonas*. Cada produto foi diluído em 4,5 ml de ADE,  
158 submetido por 3 min a agitador tipo Vórtex (modelo V-1, Boeco, Alemanha) e adicionado  
159 ao meio Kado 523, o qual foi vertido em placa de Petri (15 cm de diâmetro). Em seguida,

160 alíquotas de 5 µl das suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) foram depositadas em oito  
161 pontos equidistantes das placas as quais foram incubadas a 30°C por 72 h. O delineamento  
162 experimental foi inteiramente aleatorizado e os testes foram conduzidos com quatro  
163 repetições por isolado, cada repetição consistindo de um ponto de deposição. Os isolados  
164 que não cresceram em nível confluyente foram considerados sensíveis.

165 Foram também testados através do método de difusão em ágar (Madigan *et al.*,  
166 1997), os antibióticos em discos: ácido nalidíxico (30 µg); amoxicilina (10 µg);  
167 azitromicina (15 µg); bacitracina (10 UI); cefaclor (30 µg); cefalexina (30 µg); cefalotina  
168 (30 µg); cefixima (5 µg); clindamicina (2 µg); eritromicina (15 µg); kanamicina (30 µg);  
169 lincomicina (2 µg); neomicina (30 µg); oxacilina (1 µg); penicilina G (10 UI); pefloxacina  
170 (5 µg); tobramicina (10 µg); e vancomicina (30 µg). Alíquotas de 1 ml das suspensões dos  
171 isolados bacterianos foram depositadas em 99 ml de meio Kado 523 semi-sólido vertido  
172 sobre uma fina camada de meio ágar-água (2%), contida em placas de Petri. Após a  
173 solidificação, os discos dos antibióticos foram colocados em oito pontos equidistantes da  
174 placa de Petri (15 cm de diâmetro), as quais foram incubadas a 30°C por 24 h. O  
175 delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, com quatro repetições, sendo  
176 cada repetição constituída por um disco de antibiótico. A avaliação foi realizada pela  
177 medição do halo de inibição do crescimento bacteriano, em dois sentidos diametralmente  
178 opostos, com o auxílio de um paquímetro. Os isolados foram classificados em três grupos,  
179 de acordo com as reações de: resistência (halo  $\leq$  14 mm), média sensibilidade (14 mm <  
180 halo < 20 mm) e alta sensibilidade (halo  $\geq$  20 mm), estabelecidos conforme Acar e  
181 Goldstein (1986).

## 182 **Análise do polimorfismo genético por rep-PCR**

183 Para extração do DNA genômico total os isolados foram cultivados em meio Kado  
184 523 e após 48 horas transferidos para tubos eppendorf contendo 567 µl de TE (pH-8,0 Tris

185 HCl) e, em seguida, realizou-se a extração segundo o método CTAB (brometo de amônio-  
186 hexadeciltrimetil) (Ausubel, 1992).

187 Para as reações de rep-PCR foram utilizados os *primers* correspondentes às  
188 sequências REP, ERIC e BOX (Louws *et al.*, 1994). A reação de amplificação, com  
189 volume final de 15 µl, foi composta de: 1,5 µl de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris  
190 HCl, pH 8,8 a 25°C); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10% de DMSO; 0,4 mM de cada dNTPs; 1 µM  
191 de cada *primer* (REP, ERIC e BOX-PCR); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas, Life  
192 Sciences); 1 µl de DNA (≈ 40 ng); e água ultra pura esterilizada.

193 As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador PTC-100 (MJ-  
194 Research. Inc. Watertown - USA). As temperaturas de anelamento dos *primers* foram  
195 determinadas pela realização de testes de gradientes. Para os *primers* REP, ERIC e BOX,  
196 os reagentes foram inicialmente aquecidos a 95°C por 7 min, seguindo-se 35 ciclos de 94°C  
197 por 1 min; 44°C por 1 min para os primers REP (REP1R-I 5'IIICGICGICATCIGGC 3' e  
198 REP2-I 5'ICGITTATCIGGCCTAC 3'), 52°C por 1 min para os *primers* ERIC (ERIC1  
199 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA 3' e ERIC2C 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC  
200 3') e 53°C por 1 min para os *primers* BOXA1R (5'CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC 3'),  
201 para anelamento dos *primers* respectivamente; seguido de 65°C por 8 min para extensão da  
202 nova fita. A reação foi finalizada com uma extensão de 65°C por 15 min; seguindo-se do  
203 resfriamento dos produtos a 4°C.

204 A visualização dos fragmentos amplificados foi obtida em gel de agarose a 1,7% e  
205 a corrida realizada durante 2,5 h a 60 V em tampão TBE 0,5X, utilizando-se como  
206 marcador 100bp-DNA Ladder (GeneRuler™).

207 Como padrões de comparação, além dos três isolados de *Xcm* (IBSBF1733,  
208 IBSBF1911 e IBSBF1954), foram utilizados os isolados de *X. citri* pv. *anacardii* (IBSBF

209 2579), *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF 2586) e *X. axonopodis* pv. *spondiae* (IBSBF  
210 2885).

211 As análises de rep-PCR foram realizadas a partir da conversão da presença de  
212 fragmentos amplificados em dados binários (1 = presença e 0 = ausência do fragmento). Os  
213 valores gerados, pela posição de migração, para cada isolado foram comparados e suas  
214 semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard (Rohlf, 1992). A análise de  
215 agrupamento gerada por UPGMA foi representada por um dendrograma (NTSYS-pc 2.0,  
216 Software, USA) para avaliação da variabilidade dos isolados.

## 217 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 218 **Isolamento e identificação do patógeno**

219 Foram obtidos 100 isolados de *Xcm* de plantas de algodoeiro com sintomas típicos  
220 da mancha-angular, sendo 73 provenientes de áreas produtoras de Goiás, 11 de Mato  
221 Grosso, 10 de Mato Grosso do Sul e 6 da Bahia, abrangendo sete cultivares e populações  
222 segregantes (Tabela 1).

223 Todos os isolados foram Gram negativos, aeróbicos, não produziram pigmentos  
224 fluorescentes em meio de King B, apresentaram colônias amarelas em YDC a 33°C, urease  
225 negativa, catalase positiva, oxidase negativa e não cresceram a 40°C. Estas características  
226 confirmaram a identidade desses isolados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*  
227 (Schaad *et al.*, 2001).

228 Quando inoculados em folhas de algodoeiro, os 100 isolados de *Xcm* e os isolados  
229 IBSBF1733, IBSBF1911 e IBSBF1954 foram patogênicos a cv. Delta Penta. Os sintomas  
230 da mancha-angular foram observados a partir de dois dias após a inoculação como  
231 manchas aquosas que progrediram para necróticas a partir dos bordos. Todos os isolados  
232 foram preservados em ADE, fitas de papel de filtro e por liofilização, sendo depositados na  
233 Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de

234 Pernambuco (UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil). Cinco isolados foram depositados na  
235 Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas-SP, Brasil.

### 236 **Produção de enzimas e polissacarídeo**

237 As enzimas amilase, lipase e celulase foram produzidas pelos 100 isolados de *Xcm*  
238 (Tabela 2). Enzimas extracelulares são importantes fatores de virulência (Huang *et al.*,  
239 2008). A hidrólise do amido também foi observada em isolados de *Xcm* obtidos de lotes de  
240 sementes de algodoeiro (Balani, 2009) e a produção de lipase (Dezordi *et al.*, 2009) foi  
241 mencionada para essa subespécie. Diversos fitopatógenos são produtores de enzimas que  
242 degradam o amido, principal polissacarídeo de reserva nas células vegetais, em glicose,  
243 bem como lipídeos presentes nas membranas das células em ácidos graxos, os quais são  
244 utilizados como substratos em atividades metabólicas (Pascholati, 2005).

245 Verma e Singh (1975) verificaram que um isolado de *Xcm* com reduzida virulência  
246 ao algodoeiro apresentou atividade celulolítica menor, enquanto a atividade proteolítica  
247 permaneceu inalterada. Em concordância com este resultado, isolado altamente virulento  
248 de *Xcm* do Sudão (GSPB 2388) apresentou uma maior atividade celulolítica comparado a  
249 outros isolados de *Xcm*, sendo correlacionada com a variação dos sintomas da doença. O  
250 isolado não produziu encharcamento, porém causou pontos cloróticos que aumentaram e  
251 tornaram-se necróticos três semanas após a inoculação. Adicionalmente, as áreas cloróticas  
252 e necróticas não ficaram restritas as nervuras e exsudação bacteriana não foi observada. A  
253 celulase atua na degradação da celulose, principal componente estrutural das paredes  
254 vegetais, liberando compostos necessários ao desenvolvimento de microrganismos  
255 (Pascholati, 2005).

256 A hidrólise da caseína foi observada apenas em 15 isolados provenientes de áreas  
257 produtoras de algodoeiro da cultivar BRS Cedro em Acreúna-GO e nos seis isolados  
258 obtidos na Bahia, da cultivar ELA-BA-271 (Tabelas 1 e 2). As enzimas proteolíticas

259 agem, provavelmente, sobre as glicoproteínas da parede celular, proteínas de defesa  
260 elicitadas ou quitinases (Kyöstiö *et al.*, 1991). O comportamento observado na população  
261 estudada sugere que alguns isolados de *Xcm* podem ter sofrido alterações genéticas que  
262 acarretaram a perda da capacidade de hidrolisar a caseína.

263 Colônias elevadas e mucóides, indicativas da produção do polissacarídeo levana,  
264 foram observadas em meio suplementado com sacarose em todos os isolados de *Xcm*.  
265 Segundo Rudolph (1995), o polissacarídeo levana está envolvido no congestionamento de  
266 água nos espaços intercelulares dos tecidos infectados das plantas, promovendo os  
267 sintomas de encharcamento, tais como os observados em folhas de algodoeiro inoculadas  
268 com *Xcm*.

269 O papel de polissacarídeos extracelulares no gênero *Xanthomonas* também tem sido  
270 estudado de outras maneiras. Exopolissacarídeos purificados de *X. campestris* pv.  
271 *vesicatoria* foram testados em plantas de pimenta, tanto na forma pura como em  
272 combinação com as bactérias, induzindo respostas de encharcamento, perda de eletrólitos,  
273 descoloração e colapso das folhas. No entanto, ainda há muito a ser estudado com relação  
274 às funções dos polissacarídeos na patogênese de bactérias (Leite *et al.*, 2001). Segundo  
275 Zachowski *et al* (1989), as diferenças de virulência entre as raças de *Xcm* podem ser  
276 explicadas pela variação na quantidade e qualidade da camada de exopolissacarídeo.

### 277 **Reação de hipersensibilidade**

278 A reação de hipersensibilidade (HR) foi observada em folhas de tomateiro  
279 inoculadas com todos os isolados de *Xcm*, incluindo o isolado referência, mas não foi  
280 detectada em folhas de fumo (Tabela 2). Trabalhando com *Xcm*, Balani (2009) observou  
281 HR tanto em tomateiro quanto em fumo e Dezordí *et al.* (2009) verificaram reação positiva  
282 em folhas de fumo. No entanto segundo Romeiro (2001), muitas espécies e patovares de

283 *Xanthomonas* deixam de incitar HR em folhas de fumo, devendo ser testadas outras  
284 espécies tais como tomate, pimentão, café, maracujá e feijão.

### 285 **Sensibilidade *in vitro* a cúpricos de uso agrícola e antibióticos**

286 Todos os isolados de *Xcm* foram sensíveis a oxiclureto de cobre (1500 mg l<sup>-1</sup>),  
287 hidróxido de cobre (1614 mg l<sup>-1</sup>), oxitetraciclina (600 mg l<sup>-1</sup>), oxitetraciclina (90 mg l<sup>-1</sup>) +  
288 sulfato tribásico de cobre (1500 mg l<sup>-1</sup>) e oxitetraciclina (76,6 mg l<sup>-1</sup>) + sulfato de  
289 estreptomicina (367,2 mg l<sup>-1</sup>), e resistentes a casugamicina (60 mg l<sup>-1</sup>). Malavolta Júnior *et*  
290 *al.* (2008) verificaram que quatro isolados de *Xcm* foram sensíveis a 100, 250 e 500 ppm  
291 de princípio ativo dos produtos sulfato de estreptomicina a 15% + oxitetraciclina a 1,5%;  
292 oxitetraciclina a 3% + sulfato de cobre tribásico a 40%; oxitetraciclina a 20% e  
293 casugamicina a 2%. Esses resultados não discordam dos obtidos neste estudo com relação  
294 à casugamicina, uma vez que os 100 isolados foram resistentes a uma dosagem bem menor  
295 do produto, 60 ppm. Por outro lado, apesar da existência de relatos de resistência natural de  
296 *Xcm* a estreptomicina e a oxitetraciclina, descritos desde a década de 60 (Nafade *et al.*,  
297 1985), todos os isolados foram sensíveis. Em algodoeiro, o único cúprico registrado no  
298 controle da mancha-angular é o oxiclureto de cobre, tanto em pulverizações quanto no  
299 tratamento de sementes (Suassuna *et al.* 2006). Ao que parece, a utilização deste produto  
300 não tem promovido pressão para seleção de indivíduos resistentes, uma vez que a  
301 população estudada foi sensível à dosagem recomendada do produto comercial.

302 A sensibilidade a antibióticos e cúpricos em outras espécies de *Xanthomonas*  
303 também tem sido demonstrada. Quezado-Duval *et al.* (2003) verificaram a sensibilidade ao  
304 sulfato de cobre e a oxitetraciclina na concentração de 200 mg l<sup>-1</sup> quando avaliaram uma  
305 coleção de 389 isolados de *Xanthomonas* spp. associados ao tomateiro. Gama (2010)  
306 verificaram que isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X.*

307 *axonopodis* pv. *spondiae* e apresentaram reação idêntica aos mesmos produtos usados no  
308 presente estudo, ou seja foram resistentes apenas à casugamicina.

309 Baseado na classificação de Acar e Goldstein (1986) todos isolados de *Xcm*  
310 apresentaram resistência aos antibióticos penicilina G, lincomicina, cefalexina,  
311 clindamicina, oxacilina, cefaclor, cefalotina, cefixima e neomicina. Testando esses mesmos  
312 antibióticos com cinco isolados de *Xcm* Menten *et al.* (2005) verificaram resistência com  
313 relação aos antibióticos lincomicina, cefalexina e oxacilina e reação variável aos demais.  
314 Dezordi *et al.* (2009) também observou resistência de cinco isolados de *Xcm* a cefalexina.

315 Houve diferença na reação de sensibilidade dos 100 isolados de *Xcm* em relação a  
316 nove antibióticos (Figura 1). Mais de 76% dos isolados mostraram-se resistentes aos  
317 antibióticos ácido nalidíxico, amoxicilina, bacitracina, eritromicina, kanamicina,  
318 pefloxacina, tobramicina e vancomicina, embora alguns tenham apresentado média ou alta  
319 sensibilidade a esses antibióticos. Os isolados também apresentaram reação variável à  
320 azitromicina, sendo 22 resistentes, 61 medianamente sensíveis e 17 altamente sensíveis.  
321 Entretanto, resultados diferentes foram obtidos por Menten *et al.* (2005) que observaram  
322 cinco isolados de *Xcm* altamente sensíveis a ácido nalidíxico, kanamicina, eritromicina,  
323 pefloxacina e vancomicina.

324 Estes resultados mostram que, na natureza, os diferentes isolados de *Xcm* podem ter  
325 sofrido alterações que acarretaram variabilidade, induzindo reações distintas aos mesmos  
326 antibióticos. Segundo Padilha e Costa (2002), a resistência a antibióticos em muitos  
327 microrganismos é devida à presença de plasmídeos com genes para a síntese de enzimas  
328 que inativam antibióticos específicos. Estes são plasmídeos de resistência, ou plasmídeos R  
329 ou fatores R. Isolados com fator R podem ser mutantes que exibem diferentes tolerâncias a  
330 drogas como antibióticos e quimioterápicos, ou seja, isolados que sofreram, em algum  
331 momento, alteração na estrutura química ou física do DNA.



### 332 **Análise do polimorfismo genético por rep-PCR**

333 As análises de rep-PCR, obtidas com os primers REP, ERIC e BOX demonstraram  
334 que existe uma alta similaridade entre os isolados obtidos de plantas de algodoeiro com  
335 sintomas típicos da mancha-angular em Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia,  
336 bem como entre esses e os isolados de *Xcm* utilizados como padrão (IBSBF1733,  
337 IBSBF1911 e IBSBF1954), incluindo o isolado referência, evidenciando a identidade e  
338 pouca diversidade dos isolados dessa população. O agrupamento dos isolados com um  
339 padrão de bandas similar ao de *Xcm* utilizados para comparação nesse estudo, indica que  
340 estes compartilham características extremamente próximas, presentes nessas sequências  
341 repetitivas do cromossoma da subespécie *malvacearum*, evidenciando a identidade dessa  
342 população.

343 A análise de cluster gerada com os dados combinados de REP, ERIC e BOX  
344 (Figura 2) revelou a existência de cinco grupos com nível de similaridade de 70%. O grupo  
345 I consistiu de 98 isolados analisados, oriundos de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul  
346 e Bahia, e os isolados padrões de *Xcm* e o grupo II foi formado por apenas dois isolados  
347 oriundos da Bahia (BA5 e BA6). Os grupos III, IV e V consistiram dos isolados de *X. citri*  
348 *pv. mangiferaeindicae* (IBSBF 2586), *X. citri pv. anacardii* (IBSBF 2579) e *X. axonopodis*  
349 *pv. spondiae* (IBSBF 2585), respectivamente. Nenhum dos *primers* rep-PCR foi capaz de  
350 separar os isolados em relação a cultivar de algodoeiro e local de origem. Não foi  
351 verificada relação de rep-PCR com produção de enzimas e polissacarídeos, reação de  
352 hipersensibilidade e sensibilidade *in vitro* a cúpricos de uso agrícola e antibióticos.

353 Nunes *et al.* (2009) estudaram a variabilidade genética entre 61 isolados de *Xcm*,  
354 provenientes de diversas cultivares e regiões do Brasil, utilizando RAPD, rep-PCR e  
355 análise da região espaçadora 16S-23S rDNA e observaram baixo nível de polimorfismo  
356 (<30%) com os dados combinados de ERIC e REP. Foi possível detectar aproximadamente

357 85% de similaridade, com dois principais grupos de *Xcm*. O primeiro grupo foi formado  
358 pela maioria dos isolados provenientes do Mato Grosso e de Goiás, enquanto que, o  
359 segundo foi constituído principalmente por isolados de São Paulo. A similaridade entre  
360 isolados de Mato Grosso e Goiás foi também observada no presente trabalho, embora a  
361 ausência de isolados de São Paulo, não tenha possibilitado a confirmação de que formam  
362 um grupo a parte.

363 O baixo polimorfismo observado entre os 100 isolados de *Xcm* analisados pode  
364 indicar que existe grande fluxo gênico entre os estados de origem desses isolados,  
365 provavelmente ocasionado pelo trânsito de sementes de algodão contaminadas entre os  
366 produtores. Madani *et al.* (2010) analisando 37 isolados de *Xcm* de duas regiões do Irã por  
367 ERIC-PCR, também verificaram baixo polimorfismo, sugerindo que a disseminação  
368 ocorreu através da permuta de sementes infectadas. Futuros estudos poderão indicar se o  
369 baixo nível de polimorfismo detectado na população analisada está relacionado às raças  
370 fisiológicas de *Xcm*. Na Síria, Abdo-Hasan *et al.* (2008) caracterizaram nove raças (1, 3, 4,  
371 8, 11, 21, 26, 28 e 32) de *Xcm* utilizando ISSR e RAPD. No entanto, no Irã Madani *et al.*  
372 (2010) não conseguiram correlacionar raças de *Xcm* com a variação genotípica evidenciada  
373 por ERIC-PCR. No Brasil, o último estudo de raças fisiológicas data do início dos anos 80,  
374 e apontou a ocorrência das raças 3, 7, 8, 10, 18 e 19 dessa bactéria (Juliatti e Polizel, 2003;  
375 Moresco *et al.*, 2001).

376 Considerando que os 100 isolados de *Xcm* apresentaram alta homogeneidade na  
377 maioria dos testes fisiológicos e bioquímicos, reação variável apenas na hidrólise da  
378 caseína e sensibilidade a alguns antibióticos, bem como baixo polimorfismo genético na  
379 análise de rep-PCR, conclui-se que a população caracterizada apresenta baixa variabilidade  
380 fenotípica e genotípica. Esses resultados darão subsídios ao desenvolvimento de programas  
381 de melhoramento para resistência a mancha-angular do algodoeiro.

**382 AGRADECIMENTOS**

383 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Coordenação de  
384 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de  
385 estudo e pesquisa.

**386 REFERÊNCIAS**

- 387 Abdo-Hasan, M., Khalil, H., Debis, B., Mirali, N., 2008. Molecular characterization of  
388 syrian races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Pathology*  
389 **90**: 431 - 439.
- 390 Acar, J.F.; Goldstein, F.W., 1986. Disk susceptibility test. In: Rorian, V. (ed.). Antibiotics  
391 in laboratory medicine, pp. 27-63. Williams e Wilkins, Londres, Inglaterra.
- 392 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl,  
393 K., 1992. Current protocols in molecular biology. 740 p. Greene Publishing Association,  
394 New York, NY, USA.
- 395 Balani, D.M., 2009. Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*  
396 em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares. Tese. Universidade de  
397 São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- 398 Batista, C., 1953. Tratado de fitopatologia. 970p. Chaves Batista, Recife, Pernambuco,  
399 Brasil. (Mimiografado).
- 400 Bayles, M.B., Verhalen, L.M., 2007. Bacterial blight reactions of sixty-one Upland cotton  
401 cultivars. *The Journal of Cotton Science* **11**:40-51.
- 402 Bitancourt, A.A., 1934. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Secção de  
403 Phytopathologia durante os anos de 1931e 1932. *Archivos do Instituto Biológico de São*  
404 *Paulo* **8**: 185-196.

- 405 Brown, J.K.M., 1998. Surveys of variation in pathogen population and their applications  
406 to diseases control. In: Jones, G. (ed.). The epidemiology of plant diseases, pp.73-102.  
407 Kluwer, Dordrecht, Holland.
- 408 Cattelan, A.J., 1999. Métodos qualitativos para determinação de características  
409 bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal,  
410 p. 36. Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.
- 411 Delannoy, E., Lyon, B.R., Marmey, P., Jalloul, A., Daniel, J.F., Montillet, J.L., Essenberg,  
412 M., Nicole, M., 2005. Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv.  
413 *malvacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 63-82.
- 414 Dezordi, C., Maringoni, A.C., Menten, J.O.M., Camara, R.C., 2009. Semi-selective  
415 culture medium for *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* detection in cotton  
416 seeds (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian Journal of Plant Pathology* **3**: 39-49.
- 417 Gama, M.A.S., 2010. Caracterização fenotípica, patogênica e molecular de isolados  
418 pigmentados de *Xanthomonas* causando mancha-de-Xanthomonas em cajueiro.  
419 Dissertação. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
- 420 Hayward, A.C., 1964. Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas*  
421 *malvacearum*. *Journal of General Microbiology* **35**:287-298.
- 422 Huang, X., Zhai, J., Luo, Y., Rudolph, K., 2008. Identification of a highly virulent strain of  
423 *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *European Journal of Plant Pathology* **122**:  
424 461- 469.
- 425 Juliatti, F.C., Polizel, A.C., 2003. Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira.  
426 142p. EDUFU, Uberlândia, MG, Brasil.
- 427 Leite, B., Pascholati, S.F., Kitajima, W., Ishida, M.L., 2001. Mecanismos de adesão de  
428 bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*  
429 **9**:119-157.

- 430 Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic  
431 fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* cultivars and strains  
432 generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*  
433 **60**: 2286-2295.
- 434 Kyöstiö, S.R., Cramer, C.L., Lacy, G.H., 1991. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*  
435 extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene. *Journal of*  
436 *Bacteriology* **173**: 6537-6546.
- 437 Madani, A.S., Marefat, A., Behboudi, K., Ghasemi, A., 2010. Phenotypic and genetic  
438 characteristics of *Xanthomonas citri* subsp. *Malvacedarum*, causal agent of cotton  
439 blight, and identification of races in Iran. *Australasian Plant Pathology* **39**: 440-445
- 440 Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997. Brock biology of microorganisms,  
441 Prentice Hall, New Jersey.
- 442 Malavolta Júnior, V.A., Destéfano, S.A.L. Beriam, L.O.S., Pizzinatto, M.A., Cia, E., 2008.  
443 Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas*  
444 *axonopodis* pv. *malvacearum*. *Summa Phytopathologica* **34**: 168-171.
- 445 Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., Assis, S.M.P., Gomes, A.M.A., 2005. Manual de práticas  
446 em fitobacteriologia, 2ed. UFRPE, Recife, PE, Brasil.
- 447 Menten, J.O.M., Dezordi, C., Maringoni, A.C., Vigo-Schultz, S.C., 2005. Sensibilidade in  
448 vitro de *Xanthomonas axonopodis* pv *malvacearum*, agente causal da mancha angular  
449 do algodoeiro, à antibióticos. In: Congresso Brasileiro do Algodão, V Congresso  
450 Brasileiro de Algodão, Salvador-BA, Brasil.
- 451 Moresco, E., Yuyama, M.M., Camargo, T.V., Metha, Y.R., 2001. Manual de identificação  
452 e manejo das doenças do algodoeiro. 167p. FACUAL, Cuiabá, MT, Brasil
- 453 Nafade, S.D., Verma, J.P., 1985. Drug resistant mutants of *Xanthomonas campestris* pv.  
454 *malvacearum*. *Indian Phytopathology* **38**: 74-80.

- 455 Nunes, M.P., Bolognini, V., Mehta, Y.R., Rosato, P.H., Cia, M.A., Guiar, E., Mehta, A.,  
456 Pizzinato, Y., Chiavegato, E.J., 2009. Variabilidade genética entre os isolados de  
457 *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*  
458 **35**: 105-109.
- 459 Padilha, G., Costa, S.O.P., 2002. Genética bacteriana. pp. 55-68. In: Trabulsi, L.R.,  
460 Alterthum, F., Gompertz, O.F., Candeias, J.A.N., (ed.). Ateneu, São Paulo, Brasil.
- 461 Pascholati, S.F., 1995. Fitopatógenos. Arsenal Enzimático. In: Bergamin Filho, A.,  
462 Amorim, L., Kimati, H. (eds). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, pp.  
463 343-364. Agronômica Ceres, São Paulo, Brasil.
- 464 Quezado-Duval, A.M., Gazzoto Filho, A., Leite Júnior, R.P., Camargo, L.E.A., 2003.  
465 Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* ssp. associadas  
466 à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*  
467 **21**: 670-675.
- 468 Rohlf, F.J., 1992. NTSYS-pc- *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. State  
469 University of New York, New York.
- 470 Romeiro, R.S., 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. 279p. Imprensa Universitária  
471 UFV, Viçosa, MG, Brasil.
- 472 Rudolph, K.W.E., 1995. *Pseudomonas syringae* pathovars. In: Singh, V.S., Singh, R.P.,  
473 Kohmoto, K. (eds). Pathogenesis and host specificity in plant disease:  
474 Hystopathological, Biochemical, Genetic and molecular bases, pp. 47-138. Elsevier  
475 Science, Amsterdam, Holanda.
- 476 Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant  
477 pathogenic bacteria. 372p.3ed. APS Press, Saint Paul, USA.

- 478 Suassuna, N.D., Chitarra, L. G., Asmus, G.L., Inomoto, M.M., 2006. Manejo de doenças  
479 do algodoeiro. 8 p. 4 . Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brasil . (*Circular*  
480 *Técnica*, 97).
- 481 Verma, J.P., Singh, R.P., 1975. Cellulases, pectinases and proteases of Indian isolates of  
482 *Xanthomonas malvacearum*. *Indian Phytopathology* **28**: 379-383.
- 483 Verma J.P., Singh, R.P., 1974. Recent studies on the bacterial diseases of fiber and oil seed  
484 crops in India. In: Raychauhri S.P., Verma J.P. (eds). *Current Trends in Plant*  
485 *Pathology*, pp. 134-145, Luknow University, India.
- 486 Zachowski, A., Ebrahim-Nesbat, F., Rudolph, K., 1989. Effect of continuous darkness on  
487 susceptible cotton cotyledons. In: Klement, Z. (ed.). *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 173-  
488 178, Akadémiai Kiado, Budapest, Hungria,
- 489 Zandoná, C., Mehta, Y.R., Schuster, I., Alves, P.F.R., Bomfeti, C.A., Bibanco, K.R.P.,  
490 Silva, R.B.; Lopes, L.P., 2005. Mecanismo genético da resistência com três cultivares  
491 de algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Fitopatologia Brasileira*  
492 **30**: 647-649.
- 493

494 **Tabela 1** - Isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* obtidos a partir de folhas de  
 495 algodoeiros com sintomas da mancha-angular, oriundos de áreas produtoras nos estados de  
 496 Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS) e Bahia (BA).

Isolados	Origem	Cultivar
GO 1 a GO 11	Perolândia – GO	DP Acala 90
GO 12 a GO 21	Santa Helena do Goiás – GO	Populações segregantes
GO 22 a GO 33	Acreúna – GO	BRS Cedro
GO 34 e GO 35	Montividiu- GO	FM 977
GO 36 a GO 46	Palmeira de Goiás – GO	ELA – GO – 8022
GO 47 a GO 51	Chapadão do Céu – GO	DP 90 – Bt
GO 52 e GO 53	Santa Helena do Goiás – GO	Populações segregantes
GO 54 a GO 63	Cristalina – GO	ELA – GO – 8022
GO 64 e GO 66	Perolândia – GO	DP Acala 90
GO 67	Montividiu- GO	FM 977
GO 68	Santa Helena do Goiás – GO	Populações segregantes
GO 69	Cristalina – GO	ELA – GO – 8022
GO 70 a GO 73	Acreúna – GO	BRS Cedro
MT 1 a MT 3	Rondonópolis – MT	DP Acala 90
MT 4 a MT 11	Pedra Preta – MT	BRS Araçá
MS 1 a MS 10	Chapadão do Sul – MS	BRS Cedro
BA 1 a BA 6	Luís Eduardo Magalhães – BA	ELA – BA – 271
IBSBF 1954*	Brasil	<i>Gossypium hirsutum</i>
IBSBF 1911	Brasil	<i>Gossypium hirsutum</i>
IBSBF 1733	Sudão (Isolado referência)	<i>Gossypium</i> sp.
IBSBF 2579	Brasil	<i>Anacardium occidentale</i>
IBSBF 2585	Índia	<i>Spondias dulcis</i>
IBSBF 2586	Índia	<i>Mangifera indica</i>

497 \*IBSBF - Isolados cedidos pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São  
 498 Paulo, Brasil, utilizados como padrão de comparação.

499

500

501



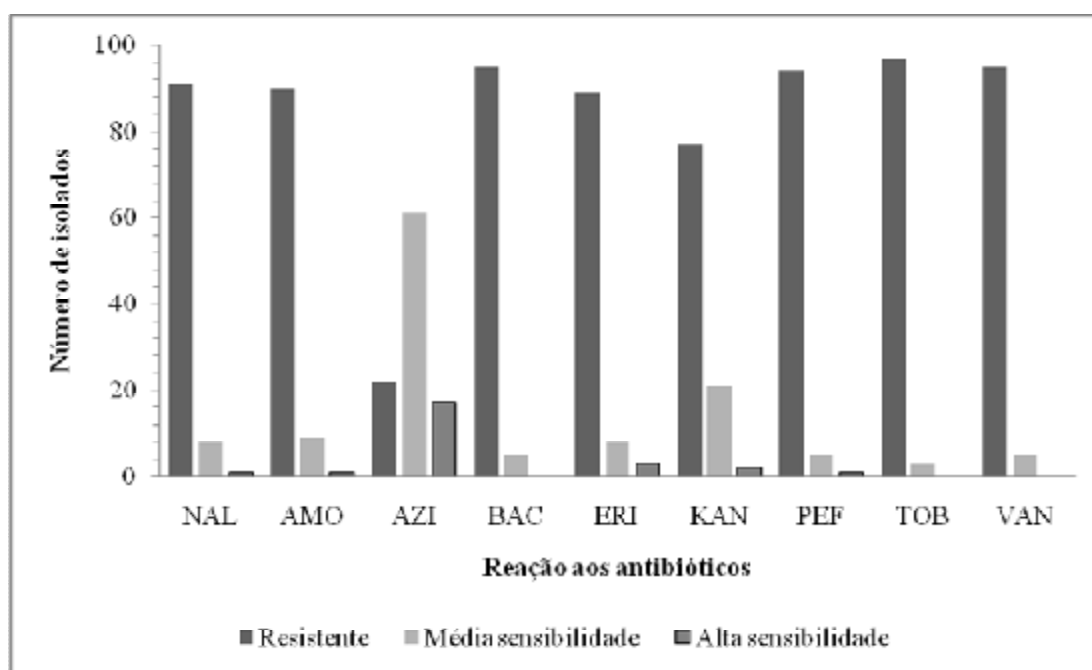
502 **Tabela 2** - Produção de enzimas, polissacarídeo levana e reação de hipersensibilidade de  
 503 100 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* obtidos em áreas produtoras de  
 504 algodoeiro nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia.

Teste	Reação/Número de isolados	
	Positiva	Negativa
<b>Enzimas</b>		
Amilase	100	0
Lipase	100	0
Caseinase	21*	79
Celulase	100	0
<b>Polissacarídeo</b>		
Levana	100	0
<b>Hipersensibilidade</b>		
Fumo	0	100
Tomate	100	0

\*15 isolados provenientes de Acreúna (GO) e 6 isolados da Bahia.

505

506

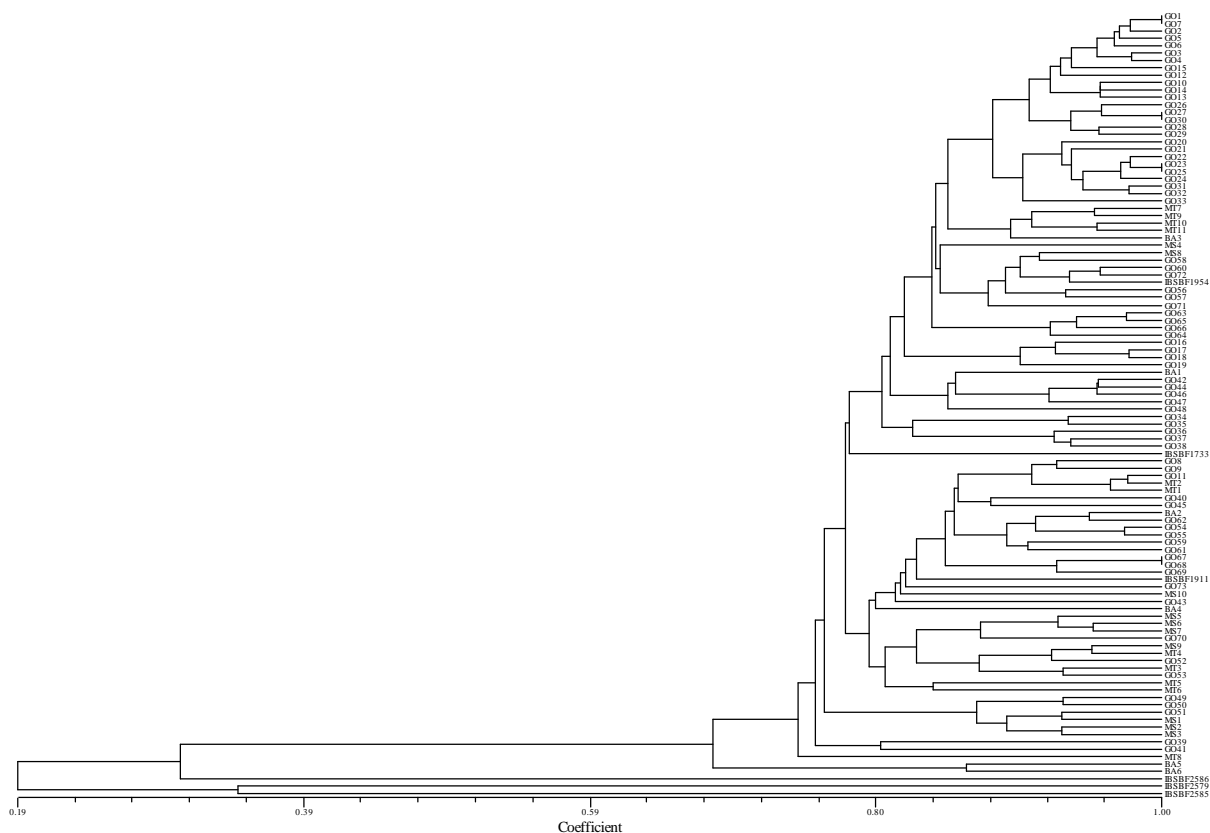


507

508 **Figura 1**- Reação de 100 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* obtidos em áreas  
 509 produtoras de algodoeiro nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia aos  
 510 antibióticos ácido nalidíxico (NAL), amoxicilina (AMO), azitromicina (AZI), bacitracina (BAC),  
 511 eritromicina (ERI), kanamicina (KAN), pefloxacina (PEF), tobramicina (TOB) e vancomicina  
 512 (VAN).

513

514



515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523

**Figura 2** – Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados pela análise combinada de REP, ERIC e BOX-PCR, mostrando a relação entre 100 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* obtidos em áreas produtoras de algodoeiro nos estados do Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO) e Bahia (BA), os isolados IBSBF1733 (NCPB 633 isolado referência), IBSBF1911 e IBSBF1954 (*X. citri* subsp. *malvacearum*), IBSBF 2579 (*X. citri* pv. *anacardii*), IBSBF 2585 (*X. axonopodis* pv. *spondiae*) e IBSBF 2586 (*X. citri* pv. *mangiferaeindicae*).

## **Capítulo III**

---

**Redução da severidade da mancha-angular do algodoeiro**

**mediada pelo silício**

## 1 **Redução da severidade da mancha-angular do algodoeiro mediada pelo silício**

2

3 Janaína Cortêz de Oliveira<sup>1</sup> Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque<sup>1</sup> Rosa de Lima Ramos  
4 Mariano<sup>1</sup> Darcy Mayra Furtado Gondim<sup>2</sup> José Tadeu Abreu de Oliveira<sup>2</sup> Elineide Barbosa  
5 da Silveira<sup>1</sup>

6 Aceito:

7

### 8 **Resumo**

9 A mancha-angular, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, é a  
10 principal doença bacteriana do algodão no Brasil e em outros países. Este trabalho avaliou  
11 o efeito do silício (Si) no controle da mancha-angular do algodoeiro, e os possíveis  
12 mecanismos envolvidos na resistência potencializada por este elemento. O silicato de  
13 cálcio (CaSiO<sub>3</sub>) foi incorporado ao solo nas doses de 0,00; 0,25; 0,50; 1,50 e 3,00 g de  
14 SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo 25 dias antes do plantio. Plantas com 33 dias tiveram as folhas inoculadas  
15 por infiltração com 0,5 mL de suspensão de *X. citri* subsp. *malvacearum* (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>).  
16 Os componentes da resistência foram avaliados a cada dois dias até 10 dias após a  
17 inoculação, quando o desenvolvimento da planta e o acúmulo de Si e Ca foram também  
18 determinados. Foram ainda analisadas a atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal  
19 e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às 6, 12 e 24 h após a inoculação em plantas +/-Si e a inibição *in*  
20 *vitro* do crescimento do patógeno. Não foi verificada diferença significativa entre os

---

<sup>1</sup> J. C. de Oliveira G. M. R Albuquerque R. L. R. Mariano (✉) E. B. da Silveira  
Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco  
52171-900 Recife, Brasil e-mail: [rmbac@gmail.com](mailto:rmbac@gmail.com)

<sup>2</sup> D. M. F. Gondim J. T. A. Oliveira  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará  
60020-181 Fortaleza, Brasil

21 tratamentos quanto ao período de incubação, incidência da mancha-angular e inibição do  
22 crescimento da bactéria. Com a aplicação da dose 1,50 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo, observou-se  
23 redução da severidade (54,9%), da área abaixo da curva de progresso da doença (35,76%)  
24 e aumento na altura das plantas (7,04%). Não foi verificado acúmulo de Si nas folhas de  
25 algodoeiro. Níveis de proteínas solúveis e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade das enzimas SOD, APX, POX,  
26 PAL e GLU foram alterados na presença do Si (1,80 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>). A redução da mancha-  
27 angular pode estar associada a estes eventos os quais são característicos de indução de  
28 resistência.

29 Palavras-chave Enzimas, *Gossypium hirsutum*, Indução de resistência, Silicato de cálcio,  
30 *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

### 31 **Abstract**

32 Angular leaf spot, which is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, is  
33 the major bacterial disease of cotton in Brazil and other countries. This study evaluated the  
34 effectiveness of silicon (Si) for the control of angular leaf spot disease of cotton and the  
35 possible resistance mechanisms enhanced by this element. Calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>) was  
36 incorporated into the soil at concentrations of 0.00, 0.25, 0.50, 1.50 and 3.00 g of SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>  
37 soil 25 days before planting. Leaves of 33-day-old-plants were inoculated by infiltration  
38 with 0.5 mL suspension of *X. citri* subsp. *malvacearum* (10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>). Components of  
39 resistance were evaluated every two days until 10 days after inoculation, at which point  
40 plant development and the accumulation of Si and Calcium (Ca) were also determined.  
41 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and the activity of enzymes related to plant defenses and were analyzed at  
42 6, 12 and 24 hours after inoculation in plants +/-Si. *In vitro* inhibition of pathogen growth  
43 due to Si was also assessed. No significant difference was seen among the treatments  
44 regarding incubation period, disease incidence or inhibition of bacterial growth. However,  
45 with the application of 1.50 g of SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> of soil, a reduction in severity (54.9%) was

46 observed along with a reduction in the area under the disease progression curve (35.76%)  
47 and an increase in plant height (7.04%). There was no observable accumulation of Si in the  
48 cotton leaves. Levels of soluble proteins and  $H_2O_2$  and activity of the enzymes SOD, APX,  
49 guaiacol peroxidase, PAL and  $\beta$  Glu were altered in the presence of Si ( $1.80 \text{ g SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$ ).  
50 The angular leaf spot disease reduction observed here may be associated with these  
51 alterations, which are characteristic of resistance induction.

52 **Keywords:** Enzymes, *Gossypium hirsutum*, induction of resistance, calcium silicate,  
53 *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

#### 54 **Introdução**

55 A mancha-angular, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith)  
56 Schaad et al., é uma doença bacteriana importante e potencialmente destrutiva em todas as  
57 áreas produtoras de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) no mundo. Segundo Suassuna et al.  
58 (2006), as perdas podem ser significativas quando as condições ambientais são favoráveis  
59 à infecção e disseminação do agente causal, sendo relatadas por Delannoy et al. (2005 )  
60 como de 5 a 35%. *X. citri* subsp. *malvacearum* afeta o algodoeiro em todas as fases de seu  
61 desenvolvimento. Nas folhas são observadas lesões angulares delimitadas pelas nervuras  
62 secundárias e terciárias, inicialmente de aspecto encharcado, tornando-se pardas  
63 posteriormente, podendo ocorrer coalescência e rasgadura do limbo foliar. Nas folhas  
64 cotiledonares, as manchas são arredondadas com aspecto encharcado. Em caso de alta  
65 severidade, além da redução da área foliar, é comum a infecção das maçãs (Suassuna *et al.*,  
66 2006).

67 O controle da mancha-angular não é satisfatoriamente realizado por cúpricos e  
68 antibióticos, dependendo, portanto, da utilização de sementes sadias e da resistência  
69 varietal (Metha et al. 2005). No entanto, as cultivares mais plantadas no Brasil, Delta Pine,

70 Acala 90 e ITA 90, são suscetíveis. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos  
71 de controle alternativo para o manejo da doença.

72 Muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de investigar o potencial do  
73 silício (Si) como protetor de culturas frente ao ataque de patógenos. Resultados  
74 promissores foram encontrados em vários patossistemas quando as culturas foram  
75 suplementadas com Si, tais como reduções da brusone do arroz, cercosporiose do cafeeiro,  
76 cancro da haste da soja, murcha-bacteriana do tomateiro, mancha-aquosa do meloeiro,  
77 mancha-bacteriana em maracujazeiro e estria bacteriana do trigo (Chang et al. 2002; Lima  
78 et al. 2009; Dannon e Wydra 2004; Ferreira 2009; Brancaglione et al. 2009; Silva et al.  
79 2010).

80 Há evidências que o envolvimento dos silicatos na indução de resistência está  
81 associado com a indução das respostas de defesa do hospedeiro, podendo ocorrer pela  
82 participação do próprio silício fortificando estruturas da parede celular, com aumento da  
83 lignificação; ativação de mecanismos específicos como a produção de fitoalexinas (Fawe  
84 et al. 2001) e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (Chérif et al. 1994).

85 Considerando que a mancha-angular é economicamente importante para o  
86 algodoeiro nas regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, as condições ambientais são  
87 favoráveis ao desenvolvimento da doença, as principais cultivares utilizadas são  
88 suscetíveis e o controle químico não é satisfatório, é prioridade a busca de novas  
89 alternativas de controle. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar se o Si controla a  
90 mancha-angular e identificar quais mecanismos estariam envolvidos na indução de  
91 resistência. A hipótese é que o Si protegerá as plantas de algodoeiro contra o processo de  
92 infecção ocasionado por *X. citri* subsp. *malvacearum*, através de mecanismos específicos  
93 de defesa como a ativação de sistemas antioxidantes e síntese de proteínas relacionadas a

94 patogênese. Dessa forma, o Si poderá ser utilizado como mais um componente para o  
95 manejo integrado da mancha-angular.

## 96 **Material e métodos**

### 97 **Incorporação de silício ao solo**

98 Foi utilizado um solo pobre em Si, com as seguintes características: pH (água 1:25)  
99 = 5,4; H + Al = 1,49  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{Al}^{+3}$  (KCl -1) = 0,0  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{Na}^+$  = 0,08  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+$   
100 (Mehlich- 1) = 0,09  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{+2}$  (KCl -1) = 1,25  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{Mg}^{+2}$  (KCl -1) = 0,75  
101  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; P (Mehlich- 1) = 9  $\text{mg dm}^{-3}$ ; argila = 30  $\text{g kg}^{-1}$ ; silte = 170  $\text{g kg}^{-1}$ ; areia = 800  $\text{g}$   
102  $\text{kg}^{-1}$ ; saturação por base = 10% e matéria orgânica = 1,27%; Si disponível (extrator  $\text{CaCl}_2$ )  
103 = 5,8  $\text{mg/dm}^{-3}$ . Cada vaso plástico de 3 kg foi preenchido com 2,5 kg de solo seco ao ar.  
104 Como fonte de Si, foi utilizado silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) contendo 16% de óxido de  
105 cálcio (CaO) e 64% de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) (Ipiranga Chemical Co., São Paulo, SP,  
106 Brasil). O silicato de cálcio foi incorporado ao solo dentro de cada vaso nas doses de 0,00;  
107 0,25; 0,50; 1,50 e 3,00  $\text{g de SiO}_2 \text{kg}^{-1}$  de solo. Os teores de Ca de todas as concentrações  
108 foram nivelados com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$  - 40% Ca, Sigma-Aldrich, St Louis, MO,  
109 USA) de forma que a única fonte de variação fossem as doses de  $\text{SiO}_2$ . Após o tratamento,  
110 o solo foi incubado por 25 dias e mantido na capacidade de campo.

### 111 **Cultivo das plantas**

112 Sementes de algodão cultivar Delta Penta suscetível à *X. citri* subsp. *malvacearum*  
113 (comercializada pela empresa MDM Sementes Ltda.) foram semeadas nos vasos após a  
114 incubação do solo (4 sementes/vaso). Realizou-se o desbaste, ficando cada vaso com duas  
115 plântulas, as quais foram adubadas quinzenalmente, a partir do transplântio, com 250  
116 ml/vaso de solução composta de 0,02  $\text{g l}^{-1}$  de Quelatec® (Bo 0,65% p/p; Fe 7,5% p/p; S  
117 7,5% p/p; Mn 3,5% p/p; Zn 0,7% p/p; Cu 0,65% p/p; Mo 0,3% p/p), 0,613  $\text{g l}^{-1}$  de Krista-



118 K45® (N<sub>2</sub>O 12%; K<sub>2</sub>O 45%; SO<sub>4</sub> 1,2%), 1 g l<sup>-1</sup> de Calcint® (NO<sub>3</sub> 14,4%; NH<sub>4</sub> 1,1 %;  
119 cálcio hidrossolúvel 19%), 0,2 g l<sup>-1</sup> de fosfato-monopotássico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 51%; K<sub>2</sub>O  
120 33%) e 0,52 g l<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 99%). As plantas foram mantidas  
121 na capacidade de campo.

## 122 **Inoculação das plantas**

123 As inoculações foram realizadas com o isolado GO 10 (obtido de algodoeiro cv. DP  
124 Acala 90, no estado de Goiás, Brasil) de *X. citri* subsp. *malvacearum*, pertencente a  
125 Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia (UFRPE, Recife-PE, Brasil). A  
126 partir de crescimento bacteriano com 48 h em meio de Kado 523 (sacarose 10 g, extrato de  
127 levedura 4 g, caseína hidrolisada 8 g, MgSO<sub>4</sub> 0,3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g e Ágar 18 g l<sup>-1</sup>), foi  
128 preparada uma suspensão em água destilada, ajustada em fotocolorímetro (Metronic M3)  
129 para a concentração de 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, adicionando-se Tween 20 (0,05%). Plantas com 33  
130 dias foram inoculadas por infiltração com uma seringa hipodérmica de 1 ml sem agulha,  
131 sendo realizados quatro pontos de inoculação por folha verdadeira e três folhas inoculadas  
132 por planta.

## 133 **Quantificação de componentes de resistência do algodoeiro à mancha-angular**

134 As plantas foram avaliadas em intervalos de 2 dias, até 10 dias após a inoculação,  
135 determinando-se os seguintes componentes de resistência da doença: a) período de  
136 incubação (PI), calculado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos  
137 sintomas da doença; b) incidência da doença (INC), calculada pela porcentagem de pontos  
138 com sintomas, dez dias após a inoculação; c) severidade da doença (SEV) aos dez dias  
139 após a inoculação, estimada com auxílio do Programa de Imagens APS Assess (American  
140 Phytopathological Society, Estados Unidos); e d) área abaixo da curva de progresso da  
141 doença (AACPD), calculada pela expressão:  $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ti}$ ; onde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são

142 os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e  $d_i$  o intervalo entre  
143 as avaliações. A severidade da doença, a cada intervalo de tempo, foi avaliada  
144 fotografando-se as folhas com lesões e escala de  $1 \text{ cm}^2$  para posterior processamento no  
145 programa APS Assess, o qual tem como resultado a área de cada lesão em  $\text{cm}^2$ .

#### 146 **Efeito do silício no desenvolvimento de plantas de algodoeiro**

147 Aos 43 dias do plantio, as plantas inoculadas com *X. citri* subsp. *malvacearum*  
148 foram avaliadas quanto à altura com auxílio de uma régua, medindo-se cada planta da base  
149 do caule até a inserção da última folha. Em seguida, as plantas foram colhidas, separadas  
150 em folhas e raízes e pesadas em balança analítica para obtenção da biomassa fresca.  
151 Posteriormente, folhas e raízes foram lavadas em água destilada para eliminação de  
152 fragmentos de solo aderidos às mesmas, e, então, acondicionadas em sacos de papel, sendo  
153 conduzida à estufa por 72 h para secagem a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após esse período, as amostras foram  
154 novamente pesadas para obtenção da biomassa seca.

#### 155 **Análise do tecido vegetal do algodoeiro para conteúdo de silício e cálcio**

156 Folhas e raízes de algodoeiro secas por 72 h a  $65^\circ\text{C}$  foram moídas em micro  
157 moinho tipo Willey (TF-648, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O conteúdo de Si foi  
158 determinado por análise colorimétrica (Elliott e Snyder 1991) e o conteúdo de cálcio por  
159 espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta et al. 1997).

160 O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente  
161 aleatorizado, com cinco repetições, estudando-se o fator doses de Si e adotando-se cinco  
162 níveis desse fator (0,00; 0,25; 0,50; 1,50 e  $3,00 \text{ g de SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de solo), totalizando 25  
163 parcelas, sendo que cada parcela foi constituída por dois vasos com duas plantas.

#### 164 **Inibição in vitro de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum***

165 Alíquotas de 3 ml da suspensão do isolado GO 10 de *X. citri* subsp. *malvacearum*  
166 contendo  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> foram adicionadas a 100 ml de meio Kado semi-sólido o qual foi  
167 vertido sobre uma fina camada de meio ágar-água (2%), contida em placas de Petri. Após a  
168 solidificação, os discos de papel de filtro embebidos na solução de Si (0,00; 0,25; 0,50;  
169 1,50 e 3,00 g de CaSiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo) foram depositados em quatro pontos equidistantes da  
170 placa de Petri, as quais foram mantidas em B.O.D. a 30 °C. O delineamento experimental  
171 foi inteiramente aleatorizado com cinco diferentes tratamentos de Si e quatro repetições,  
172 constituídas por um disco de papel de filtro. A avaliação foi realizada 48 horas após a  
173 incubação observando-se a presença de halos de inibição de crescimento da bactéria.

#### 174 **Determinação de atividades enzimáticas e peróxido de hidrogênio**

175 Para avaliar a atividade enzimática em plantas de algodoeiro, um segundo  
176 experimento foi instalado em casa de vegetação, utilizando-se a dose de 1,80 g de SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>  
177 de solo, obtida a partir da equação de regressão, com base nos dados da severidade da  
178 doença. O experimento foi realizado da mesma forma do estudo de quantificação de  
179 componentes de resistência do algodoeiro à mancha-angular.

180 As plantas foram cultivadas na presença ou ausência de Si (+/-Si) e inoculadas com  
181 o isolado GO 10 de *X. citri* subsp. *malvacearum*. As folhas foram coletadas nos tempos 6,  
182 12 e 24 horas após a inoculação sendo imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e  
183 conservadas em freezer a -20 °C. O experimento foi conduzido em delineamento  
184 inteiramente aleatorizado com três repetições, constituídas por três vasos de 3 kg com três  
185 plantas cada.

186 Para determinação das proteínas solúveis e atividades enzimáticas, as amostras  
187 foram maceradas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo 0,15 M de NaCl; 3  
188 % de PEG; 1 mM de EDTA e 1% de PVPP, na proporção de 1:2 (m/v), por 5 minutos, em

189 almofariz, sob banho de gelo. Após maceração, a suspensão foi filtrada em trama de malha  
190 fina e centrifugada (10.000 x g, 4 °C, 20 minutos). O sobrenadante foi então dialisado por  
191 72 horas a 4 °C, contra o tampão de extração. Esta preparação foi denominada extrato total  
192 e estocada em freezer a -20 °C.

193 As proteínas foram dosadas de acordo com a metodologia descrita por Bradford  
194 (1976). A atividade da superóxido dismutase – SOD foi analisada pelo método de Van  
195 Rossum et al. (1997), modificado para uso em placas de 96 poços, para ELISA (Martins-  
196 Miranda, 2002). Este método determina a inibição da redução de *p*-nitro blue tetrazolium  
197 pelos extratos enzimáticos. A enzima peroxidase do ascorbato – APX foi determinada  
198 utilizando-se os substratos ácido ascórbico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, segundo Peixoto et al. (1999). A  
199 peroxidase do guaiacol – POX foi avaliada segundo a metodologia descrita por Urbanek et  
200 al. (1991) empregando-se guaiacol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substratos. A atividade da fenilalanina  
201 amônia liase – FAL foi analisada pela medição da quantidade de ácido cinâmico  
202 produzido, como descrito por Mori et al. (2001) e El-Shora (2002). Por fim, a enzima β-  
203 1,3-glucanase (GLU) foi determinada pelo método descrito por Boller (1993) e medida em  
204 função da velocidade de liberação de glucose a partir da degradação da laminarina.

205 A quantificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi baseada na formação do  
206 complexo laranja férrico-xilenol descrita por Gay et al. (1999). Amostras foram maceradas  
207 em tampão Borax-Borato 50 mM, pH 8,4, a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g, a 4  
208 °C, por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para ensaio. Uma curva padrão com  
209 concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 – 8,0 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1,2 ml) foi construída e utilizada  
210 para determinar a quantidade existente desse composto no tecido vegetal.

### 211 **Análises estatísticas dos dados**

212 Para os dados dos componentes de resistência do algodoeiro a mancha-angular e  
213 promoção de crescimento, foram realizadas análises de variância e de regressão,

214 desdobrando-se todos os graus de liberdade dos tratamentos em efeitos de regressão. Para  
215 cada variável estudada, uma equação de regressão foi ajustada considerando-se os efeitos  
216 quadráticos significativos na análise de variância ( $P \leq 0,05$ ). Todos os experimentos foram  
217 conduzidos duas vezes. Como foi detectada reprodutibilidade dos dados entre os  
218 experimentos, sem diferenças significativas, realizou-se análise conjunta dos dados.

219 Para as atividades enzimáticas foram realizadas análises de variância dentro de  
220 cada tempo de medida ( $P \leq 0,05$ ). Como só havia dois tratamentos, os resultados obtidos  
221 com o teste F foram usados para expressar as diferenças entre as médias dos tratamentos.

## 222 **Resultados**

### 223 **Quantificação de componentes de resistência do algodoeiro à mancha-angular**

224 Não houve diferença significativa entre os tratamentos com Si para PI e INC. Os  
225 primeiros sintomas da doença, inicialmente manchas aquosas, tornaram-se evidentes nas  
226 plantas suplementadas ou não com Si aos dois dias após inoculação com 100% de INC.  
227 Necrose nos bordos das lesões foram observadas nos últimos dias de avaliação.

228 As análises de regressão (Fig. 1A e 1B) mostraram efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) das  
229 diferentes doses de Si testadas na SEV e AACPD. Todas as doses reduziram a SEV e  
230 AACPD que atingiram valores máximos de 54,9 e 35,8%, respectivamente, quando  
231 utilizado 1,50 g de  $\text{SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de solo. Com base nas equações de regressão dessas variáveis,  
232 determinou-se que a dose de 1,80 g de  $\text{SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de solo seria a mais eficiente para o  
233 controle da doença.

### 234 **Efeito do silício no desenvolvimento de plantas de algodoeiro**

235 Foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), entre doses de Si para as  
236 variáveis: altura da planta (AP), biomassa fresca de folhas (BFF) e biomassa seca de folhas  
237 (BSF). As plantas de algodoeiro suplementadas com Si na dose 1,50 g  $\text{SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de solo

238 apresentaram incremento na AP de até 7,04% em relação à testemunha (Fig. 2A), como  
239 também acréscimos na BFF e BSF, respectivamente de 12,24% e 5,08%, foram observados  
240 quando se utilizou a dose de 3,00 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo (Fig. 2B e 2C). As biomassas fresca e  
241 seca das raízes não foram influenciadas pelas doses de Si.

#### 242 **Análise do tecido vegetal do algodoeiro para conteúdo de silício e cálcio**

243 O conteúdo de Si nas folhas e Ca nas raízes foi significativamente diferente  
244 ( $P \leq 0,05$ ), em relação às doses de Si utilizadas, embora o conteúdo nas folhas não tenha  
245 sido superior à testemunha (Fig. 3A). Com relação ao Ca nas raízes, detectou-se o acúmulo  
246 de 3,97% deste elemento apenas na dose de 1,50 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo (Fig. 3B). Os teores de  
247 Si nas raízes e Ca nas folhas não foram influenciados pelas doses testadas.

#### 248 **Inibição in vitro de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum***

249 O silicato de cálcio em nenhuma das doses testadas foi capaz de inibir o  
250 crescimento de *X. citri* subsp. *malvacearum* in vitro.

#### 251 **Determinação de atividades enzimáticas e peróxido de hidrogênio**

252 Em plantas tratadas com Si (+Si) e inoculadas com *X. citri* subsp. *malvacearum*,  
253 observou-se aumento na quantidade de proteínas solúveis totais às 24 h após a inoculação,  
254 em relação as não tratadas (-Si) (Fig. 4).

255 Níveis significativamente menores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram verificados em plantas +Si em  
256 relação às plantas -Si às 12 horas após inoculação (Fig. 5 A).

257 Com relação às enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, verificou-se que a SOD  
258 foi fortemente potencializada nas plantas +Si no tempo 12 h após a inoculação (Fig. 5 B).

259 A APX teve sua atividade diferenciada entre os tratamentos (+Si e -Si) no tempo 6  
260 h após a inoculação, quando ocorreu uma atividade maior nas plantas -Si (Fig. 5 C). No  
261 entanto, observou-se uma maior estabilidade na atividade da APX nas plantas +Si.

262 Com relação às proteínas associadas com a defesa vegetal, a POX, teve sua maior  
263 atividade no tratamento +Si (Fig. 5 D). Observou-se a produção de PAL apenas nas plantas  
264 +Si (Fig. 5 E), enquanto a GLU foi detectada em ambos os tratamentos, embora  
265 apresentando maior expressão em plantas +Si às 24 h após a inoculação (Fig. 5 F).

## 266 **Discussão**

267 A aplicação de diferentes doses de Si ao solo, mesmo não tendo afetado o PI e a  
268 INC, reduziu a SEV (54,9%) e a AACPD (35,8%) em plantas de algodoeiro inoculadas  
269 com *X. citri* subsp. *malvacearum* (Fig. 1), indicando o potencial do uso do Si no controle  
270 dessa doença. Não foram encontrados relatos do uso de Si no controle da mancha-angular  
271 do algodoeiro, no entanto, existem estudos nessa cultura relacionados a outros  
272 fitopatógenos. Aquino et al. (2008) avaliaram os efeitos da aplicação de 3,6 e 4,8 kg ha<sup>-1</sup> de  
273 silicato de potássio no controle da mancha de *Ramularia*, porém, verificaram a ineficiência  
274 do Si no controle da doença. Reduções na severidade da ramulose e mancha de *Ramularia*  
275 em algodoeiro foram obtidas com o uso do Si e potássio, separados ou associados, em  
276 programas de aplicação de fungicidas (Machado et al. 2009).

277 O efeito do Si na redução da severidade de doenças bacterianas tem sido relatado  
278 em alguns patossistemas. Dannon e Wydra (2004) verificaram que a incidência de murcha  
279 causada por *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro, tanto suscetíveis (L390)  
280 quanto moderadamente resistentes (King Kong2), foi significativamente reduzida com a  
281 adição de silicato de potássio (1,4 mMol Si(OH)<sub>4</sub>) à solução nutritiva. Da mesma forma,  
282 Diogo e Wydra (2007) avaliando a murcha-bacteriana nos genótipos King Kong 2  
283 (moderadamente resistente) e Hawaii 7998 (resistente), tratados com silicato de potássio  
284 (1,4 mMol Si(OH)<sub>4</sub>) em solução nutritiva, observaram redução da incidência em 38,1% e  
285 100% e da área abaixo da curva de progresso da doença em 33,8% e 81,2%,  
286 respectivamente. Ressalte-se que este patossistema é bem diferente do estudado no presente

287 trabalho, já que se trata de um patógeno habitante do solo, que penetra pelas raízes e  
288 coloniza o xilema das plantas. No entanto, sucessos em patossistemas mais semelhantes à  
289 mancha-angular do algodoeiro já foram relatados em, por exemplo, hospedeiras  
290 monocotiledôneas como arroz e trigo, conhecidas como acumuladoras de Si, e, mais  
291 recentemente, com as dicotiledôneas meloeiro e maracujazeiro, sendo a primeira  
292 considerada acumuladora intermediária, enquanto que para a segunda não há referências  
293 sobre a capacidade de acumular Si.

294 Nesse contexto, a aplicação de escória de Si (0, 2 e 4 t ha<sup>-1</sup>) em campo, para testar  
295 quatro variedades de arroz com diferentes graus de resistência à escaldadura das folhas (*X.*  
296 *oryzae* pv. *Oryzae*), reduziu, significativamente, o comprimento das lesões na ordem de 5 a  
297 22% (Chang et al. 2002). Silva et al. (2010) estudaram a resistência do trigo à estria  
298 bacteriana, causada por *X. translucens* pv. *undulosa*, e observaram 50,2% de redução na  
299 área clorótica das folhas quando se adicionou ao solo 0,3 g kg<sup>-1</sup> de volastonita (fonte de  
300 Si). Em dicotiledôneas, Ferreira (2009), estudando o efeito de diferentes doses de silicato  
301 de cálcio em meloeiro para controle da mancha-aquosa causada por *Acidovorax citrulli*,  
302 verificou que a aplicação de 3,0 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo, reduziu significativamente a  
303 incidência, o índice de doença, a área abaixo da curva de progresso da doença e aumentou  
304 o período de incubação. Também, a severidade da mancha-bacteriana do maracujazeiro  
305 causada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi reduzida por pulverizações foliares com  
306 argila silicatada nas concentrações entre 1 e 2%, de modo curativo (Brancaaglione et al.  
307 2009).

308 O silicato de cálcio não inibiu o crescimento de *X. citri* subsp. *malvacearum* em  
309 meio de cultura, em nenhuma das concentrações testadas, o que indica ausência de efeito  
310 bactericida ou bacteriostático desse elemento sobre a bactéria. Estes resultados corroboram  
311 com os encontrados por Ferreira (2009), que testou as mesmas doses e fonte de Si para a *A.*



312 *citrulli*, outra bactéria fitopatogênica, também, Gram negativa. Lopes (2006), utilizando  
313 diferentes doses e fontes de Si, também, não detectou diferença significativa na  
314 porcentagem de germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.  
315 Entretanto, o índice de crescimento micelial foi reduzido, principalmente pela fonte pura  
316 de Si, o ácido silícico. Resultados diferentes foram encontrados por Brancaglione et al.  
317 (2009) nos quais diferentes concentrações de argila silicatada foram capazes de inibir o  
318 crescimento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* *in vitro*.

319 Os resultados obtidos concordam com Lima Filho (2001) quando discute que o Si  
320 parece não afetar diretamente os patógenos, não sendo considerado um fungicida e/ou  
321 bactericida, e, portanto, não causando pressão de seleção. Além disto, a maioria dos  
322 estudos tem mostrado que o controle de doenças mediado pela aplicação de Si ocorre por  
323 indução dos mecanismos de defesa da planta hospedeira (Fawe et al. 2001).

324 O Si não é considerado um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas,  
325 mas tem demonstrado efeitos benéficos para várias espécies. O fortalecimento das plantas  
326 se dá pela sua deposição, acumulação e expansão na parede celular (Epstein 1994). Foi  
327 observado neste trabalho que plantas de algodoeiro suplementadas com Si apresentaram  
328 aos 43 dias incrementos na AP (7,04%), BFF (12,24%) e BSF (5,08%) (Fig. 2). Pesquisas  
329 indicam que em algodoeiro a adubação via solo com Si, também, pode aumentar o número  
330 total e tamanho de capulhos, ramos frutíferos e porcentagem de fibra (Lima Filho 2001).  
331 Boylston et al. (1990) mencionaram que o Si foi importante em aumentar a resistência das  
332 fibras de algodão ao formar complexos com a pectina e a calose. Ferreira (2009)  
333 constatou, também, aumentos na altura (9,15%), biomassa fresca (23,87%) e seca da parte  
334 aérea (33,36%) em meloeiros que receberam adubação com silicato de cálcio. Ganhos na  
335 altura de copas de tomateiro (9,8%) foram observados por Lopes (2006) ao utilizar o  
336 silicato de cálcio.

337 A inexistência de acúmulo de Si nas folhas das plantas tratadas com as diferentes  
338 doses de Si e o aumento de Ca nas raízes apenas com a aplicação da dose 1,50 g SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>  
339 de solo (Fig. 3), indica que o algodoeiro é uma planta não acumuladora desse elemento.  
340 Muitas plantas de culturas importantes são reconhecidas como não acumuladoras e são  
341 incapazes de transportar Si através das raízes, mesmo quando a concentração deste  
342 elemento no solo é alta e, portanto, falham em acumular grandes quantidades na parte  
343 aérea (Datnoff et al. 2001). Diferentemente, o Si tem sido detectado na parte aérea de  
344 plantas acumuladoras, a exemplo de sorgo e arroz ou intermediárias como soja, feijoeiro e  
345 meloeiro.

346 Resende et al. (2009) estudando a influência de doses de silicato de cálcio aplicadas  
347 ao solo no comportamento de linhagens de sorgo a *Colletotrichum sublineolum*  
348 observaram que o teor foliar de Si aumentou de forma linear em função das doses  
349 crescentes com um incremento de 55 e 58%, respectivamente, nas linhagens suscetível e  
350 resistente. Porém, não houve diferença significativa quanto ao teor foliar de Ca entre as  
351 duas linhagens e nem entre as combinações de doses de volastonita (fonte de Si) e  
352 carbonato de Ca. Em soja, Lima et al (2010) estudando o efeito de aplicações de silicato de  
353 potássio em solução nutritiva na severidade da ferrugem asiática e sobre a nutrição das  
354 plantas verificaram uma redução na área abaixo do comprimento de lesões, enquanto que  
355 os teores de P, Ca, S e Zn, clorofila b, carotenóides e lignina, na parte aérea, aumentaram  
356 com a adição de Si. Aumento no teor de Si foliar também foi verificado por Moraes et al.  
357 (2009) em feijoeiro tratado com silicato de cálcio, sendo este aumento associado à  
358 reduções da incidência da antracnose, porém com decréscimos nos teores de K, Mg, S, Zn  
359 e Ca. Em meloeiro, planta de acumulação intermediária de Si, Ferreira (2009) verificou  
360 acúmulo desse elemento na parte aérea de meloeiros inoculados com *A. citrulli* e tratados

361 com doses crescentes de silicato de cálcio no solo, podendo ter contribuído para a redução  
362 da severidade da mancha-aquosa.

363 Mesmo não tendo sido detectado o acúmulo de Si na folhas, plantas de algodoeiro  
364 apresentaram redução na severidade da mancha-angular. Nas plantas não acumuladoras, o  
365 Si desempenharia um papel indireto induzindo enzimas removedoras de espécies reativas  
366 de oxigênio, e também enzimas responsáveis pela degradação de parede celular de  
367 patógenos (Datnoff et al. 2001).

368 Em plantas tratadas com Si e inoculadas com *X. citri* subsp. *malvacearum*,  
369 observou-se aumento da quantidade de proteínas solúveis totais (Fig. 4). Esse aumento  
370 pode estar relacionado à reprogramação genética, levando à síntese *de novo* de proteínas.  
371 Também, Kuhn (2007) ao utilizar o acibenzolar-S-metil (ASM) em feijoeiros desafiados  
372 por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* obteve alteração nos níveis de proteínas totais, indicando  
373 que este fato estaria relacionado à síntese de proteínas associadas à patogênese, além de  
374 outras proteínas de defesa vegetal.

375 O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi menor nas plantas tratadas com Si as 12 h após a inoculação  
376 (Fig. 5A). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é uma das espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ter a  
377 produção aumentada pelas plantas em condições de estresse biótico, neste caso a  
378 inoculação com *X. citri* subsp. *malvacearum*, ou abiótico. A membrana de bactérias é  
379 sensível às EROs, e desse modo, a explosão oxidativa atua como parte das estratégias de  
380 defesa das plantas, na limitação da colonização por esses patógenos (Elstner 1982). Além  
381 disso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como indutor da expressão gênica de diversas proteínas, entre elas, as  
382 enzimas antioxidativas. Embora o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha papel importante na proteção vegetal, o  
383 acúmulo excessivo é prejudicial, podendo levar à oxidação de proteínas, ácidos graxos  
384 insaturados e DNA, causando danos celulares e eventual morte da célula (Halliwell 2006),  
385 inclusive pode inativar enzimas como a SOD (Bowler et al. 1994), fato também observado

386 no presente trabalho (Fig. 5 B). Assim, no tempo 12 horas após a inoculação, quanto maior  
387 a quantidade de  $H_2O_2$  menor a atividade da SOD (-Si) e vice-versa (+Si), observando-se  
388 complementação das duas curvas (Figs. 5 A e 5 B). Desta forma, a redução de  $H_2O_2$  nos  
389 tecidos foliares de plantas +Si, que poderia ser considerada como uma redução das defesas  
390 do algodoeiro contra a bactéria estudada pode significar, também, a manutenção de altos  
391 níveis de uma enzima como a SOD, importante para a autodefesa da planta contra níveis  
392 elevados dos radicais superóxidos.

393 A atividade de APX diferiu entre os tratamentos somente no tempo 6 horas após  
394 inoculação, sendo maior nas plantas -Si, embora mais estável nas plantas +Si (Fig. 5 C).  
395 Esta enzima, considerada a mais importante na eliminação do  $H_2O_2$  do citosol e  
396 cloroplastos (Inzé e Montagu 1995) utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons  
397 específicos para reduzir o peróxido à água. O fato de que a APX não diferiu em níveis  
398 entre os tratamentos +Si e -Si, nos tempos 12 e 24 h após a inoculação (Fig. 5 C), mesmo  
399 quando o nível de  $H_2O_2$  estava muito baixo (Fig. 5 A) sugere que outras enzimas  
400 removedoras de EROs, a exemplo da catalase, poderiam ter atuado nesta remoção. No  
401 entanto, este fato não foi comprovado uma vez que a atividade enzimática da catalase e  
402 outras enzimas antioxidantes não foi analisada.

403 Em algodoeiro, a maior atividade de POX foi observada no tratamento +Si (Fig. 5  
404 D). As POXs de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, por  
405 participarem nos processos de reforço da parede celular de plantas hospedeiras como a  
406 oxidação de fenóis, suberização e lignificação durante as reações de defesa contra  
407 patógenos (Syros et al. 2004). Desta forma, na maioria dos casos, o aumento na atividade  
408 da POX está diretamente relacionado à redução da severidade da doença, o que pode ter  
409 ocorrido no presente trabalho.

410 A atividade de PAL foi observada apenas nas plantas tratadas com Si (Fig. 5 E). O  
411 marcante aumento na atividade dessa enzima pode estar indicando a ativação da rota dos  
412 fenilpropanóides. Por ser uma enzima chave que atua no metabolismo secundário dos  
413 fenilpropanóides, o efeito protetor do Si pode ser relacionado, também, à produção de  
414 compostos secundários incluindo ácido salicílico, fitoalexinas e polímeros precursores da  
415 lignina (La Camera et al. 2004).

416 Apesar da GLU ter sido detectada em ambos os tratamentos, sua maior expressão  
417 ocorreu às 24 h após a inoculação nas plantas +Si (Fig. 5 F). A GLU é uma proteína  
418 relacionada à patogênese pertencente à família PR-2. Esta enzima possui atividade  
419 hidrolítica, quebrando polímeros estruturais, como  $\beta$ -1,3-glucanos, presentes nas paredes  
420 dos patógenos e tem sua atividade aumentada quando as plantas são tratadas com indutores  
421 de resistência (Labanca 2002). No presente trabalho, o Si levou a um maior acúmulo de  
422 GLU em folha de algodoeiro.

423 Chérif et al. (1994) relataram que em plantas de pepino tratadas com 1,7 mM de  
424 silicato de potássio em solução nutritiva e inoculadas com *Pytium aphanidermatum*, a  
425 atividade dessa enzima foi altamente expressa. Apesar de  $\beta$ -1,3-glucanos não serem  
426 constituintes da parede celular de bactérias fitopatogênicas, composto similar como o  $\beta$ -  
427 1,2-glucano cíclico extracelular de *X. campestris* pv. *campestris* está relacionado à  
428 virulência desta bactéria em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana*, sendo  
429 transportado sistemicamente através da planta e suprimindo defesas locais e sistêmicas do  
430 hospedeiro (Rigano et al. 2007). Glucanos cíclicos também são produzidos por outras  
431 bactérias fitopatogênicas (Rigano et al. 2007) e podem ser alvos de glucanases. Aliás, isto  
432 foi demonstrado por Klarzynski et al. (2000) os quais utilizaram  $\beta$ -1,3-glucanos lineares  
433 (laminarina) para induzir respostas de defesa em fumo (produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAL, ácido  
434 salicílico, glucanases e quitinases, entre outros) e ainda obtiveram forte redução da

435 infecção por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* quando as plantas foram  
436 inoculadas cinco dias após a indução.

437 Diante dos resultados obtidos, através da análise das enzimas e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e  
438 considerando ainda que o Si não atuou diretamente sobre o patógeno, há evidências que o  
439 tratamento com Si, mobilizou a maquinaria metabólica do algodoeiro desencadeando uma  
440 sequência de eventos característicos da indução de resistência das plantas tratadas, que se  
441 traduziu na redução da severidade da mancha-angular e da área abaixo da curva de  
442 progresso da doença.

#### 443 **Referências**

- 444 Aquino, L. A., Berger, P. G., Rodrigues, F. A., Zambolim, L., Ogoshi, F., Miranda, L.M. &  
445 Lélis, M.M. (2008). Controle alternativo da mancha de *Ramularia* do algodoeiro,  
446 *Summa Phytopathologica*, 34, 131-136.
- 447 Boller, T. (1993). Biochemical analysis of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases. In S. J. Curr, M.  
448 J. McPherson, & D. J. Bowles (Eds.), *A Practical Approach* (pp. 23–29). New York:  
449 Oxford University Press.
- 450 Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1994). Superoxide dismutase in  
451 plants. *Critical Review in Plant Science*, 13, 199-218.
- 452 Boylston, E. K., Hebert, J. J., Hensarling, T. P., Bradow, J. M. & Thibodeaux, D. P.  
453 (1990). Role of silicon in developing cotton fibers. *Journal of plant nutrition*, 13,  
454 131-148.
- 455 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of micrograms  
456 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*  
457 *Biochemistry*, 72, 248-254.
- 458 Brancaglione, P., Sampaio, A. C., Fischer, I. H., Almeida, A. M. & Fumis, T. F. (2009).  
459 Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv.

- 460 *passiflorae*, *in vitro* e em mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Brasileira de*  
461 *Fruticultura*, 31, 718-724.
- 462 Chang, S. J., Tzeng, D. D. S., & Li, C. C. (2002). Effect of silicon nutrient on bacterial  
463 blight resistance of rice (*Oryza sativa* L.) In *Conference*. (pp.31-33). Kyoto: Press-  
464 Net.
- 465 Chérif, M., Asselin, A. & Bélanger, R. R. (1994). Defense responses induced by soluble  
466 silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. *Phytopathology*, 84, 236-242.
- 467 Dannon, E., & Wydra, K. (2004). Interaction between silicon amendment, bacterial wilt  
468 development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes.  
469 *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 233-243.
- 470 Datnoff, L. E.; Seebold, K. W., & Correa, V. F. J. (2001). The use of silicon for integrated  
471 disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant  
472 resistance. In L. E. Datnoff, G. H. Snyder, & G. H. Korndörfer (Eds.), *Silicon in*  
473 *Agriculture* (pp. 171-183). Amsterdam: Elsevier Science.
- 474 Delannoy, E., Lyon, B. R., Marmey, P., Jalloul, A., Daniel, J.F., Montillet, J.L., Essenberg,  
475 M., & Nicole, M. (2005). Resistance of Cotton Towards *Xanthomonas campestris*  
476 pv. *malvacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 63-82.
- 477 Diogo, R. V. C., & Wydra, K. (2007). Silicon-induced basal resistance in tomato against  
478 *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polisaccharide  
479 structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70, 120-129.
- 480 Elliott, C. L., & Snyder, G. H. (1991). Autoclave-induced digestion for the colorimetric  
481 determination of silicon in rice straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,  
482 39, 1118-1119.
- 483 El-Shora, H. M. (2002). Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow  
484 cotyledons. *Plant Science*, 162, 1-7.

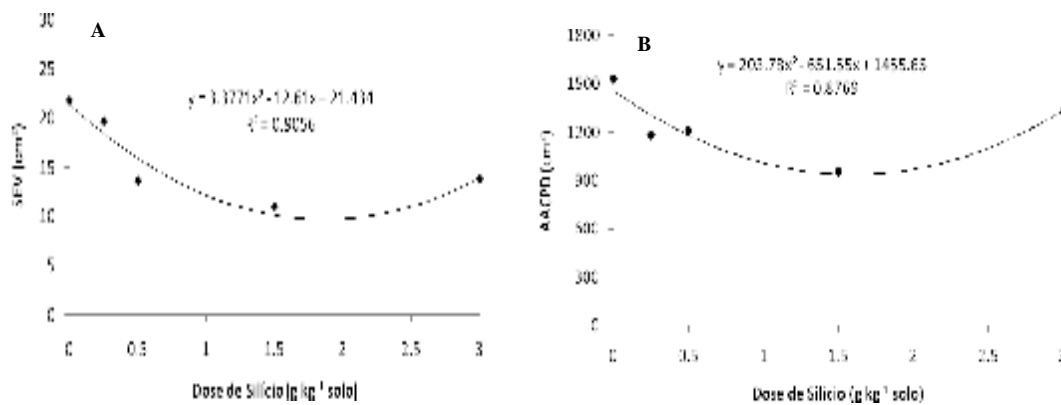
- 485 Elstner, E. F. (1982). Oxygen activation and toxicity. *Annual Review of Plant Physiology*,  
486 33, 73-96.
- 487 Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings Natural Academy*  
488 *Science*, 1, 11-17.
- 489 Fawe, A., Menzies, J. G., Chérif, M., & Bélanger, R. R. (2001). Silicon and disease  
490 resistance in dicotyledons. In Datnoff, L. E., Snyder, G. H., & Korndörfer, G. H.  
491 (Eds.), *Silicon in Agriculture: studies in plants in plant science* (pp. 159-169).  
492 Amsterdam: Elsevier.
- 493 Ferreira, H. A. (2009) *Silício no controle da mancha-aquosa em meloeiro (Cucumis melo*  
494 *L.)*. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 495 Gay, C., Collins, J., Gebicki, J. M. (1999). Hidroperoxide assay with the ferric-xylenol  
496 orange complex. *Analytical Biochemistry*, 273, 149-155.
- 497 Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental  
498 theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- 499 Inzé, D., & Montagú, M. V. (1995). Oxidative stress in plants. *Current opinion in*  
500 *Biotechnology*, 6, 153-158.
- 501 Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, B. K., & Friting, B. (2000).  
502 Linear  $\beta$ -1,3-glucans are elicitors of defense responses in Tobacco. *Plant Physiology*,  
503 124, 1027-1037.
- 504 Kuhn, O. J. (2007). *Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) por*  
505 *acibenzolar-S-metil e Bacillus cereus: aspectos fisiológicos e bioquímicos e*  
506 *parâmetros de crescimento e produção*. Tese, Universidade de São Paulo,  
507 Piracicaba, Brasil.



- 508 La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., & Heitz, T.  
509 (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of  
510 phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Review*, 198, 267-284.
- 511 Labanca, E. R. G. (2002). *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces*  
512 *cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus)*  
513 *contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*  
514 Dissertação, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- 515 Lima Filho, O. F. (2001). O silício é um fortificante e antiestressante natural para as  
516 plantas. Dourados, Disponível em: <<http://www.cpa0.embrapa.br/portal/artigos2htm>>.  
517 Acesso em: 21 mai. 2010.
- 518 Lima, L. M., Pozza, E. A., Pozza, A.A A. A., Fonseca, T. A. P. S., & Carvalho, J. G.  
519 (2010). Quantificação da ferrugem asiática e aspectos nutricionais de soja suprida  
520 com silício em solução nutritiva. *Summa Phytopathological*, 36, 51-56.
- 521 Lopes, A. C. F. (2006). *Efeito de fontes de silício no controle de Fusarium oxysporum f.*  
522 *sp. lycopersici em tomateiro (Lycopersicum esculentum Mill.)* Dissertação,  
523 Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.
- 524 Machado, A. Q., Cassetari Neto, D., Andrade Júnior, E. R., Vidotti, E. D., & Rivelini, V.  
525 E. (2009). *Controle de ramulose (Colletotrichum gossypii var. areola) em algodoeiro*  
526 *com programas de aplicações de fungicidas e nutrientes foliares.* In Congresso  
527 Brasileiro do algodão – *Anais*. Foz do Iguaçu – PR, Brasil.
- 528 Malavolta, E., Vitti, G. C., & Oliveira. S. A. (1997). *Avaliação do estado nutricional das*  
529 *plantas: princípios e aplicações.*(p. 341) Piracicaba: POTAFOS.
- 530 Martins-Miranda, A. S. (2002). *Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e*  
531 *abióticos em plântulas de feijão-de-corda [Vigna unguiculata (L.) walp.] exposta à*

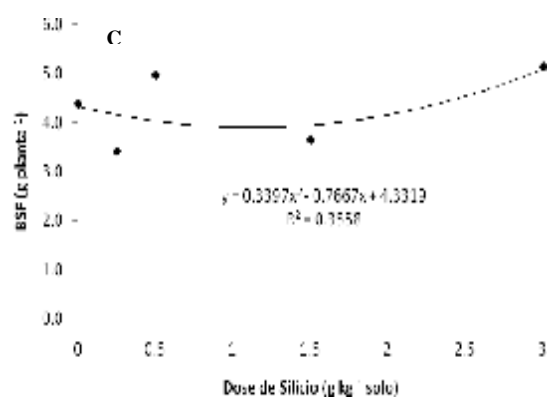
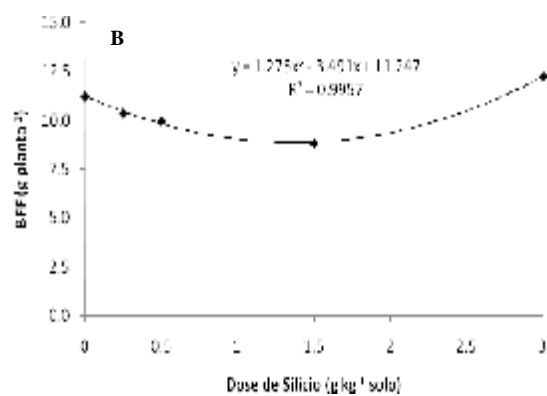
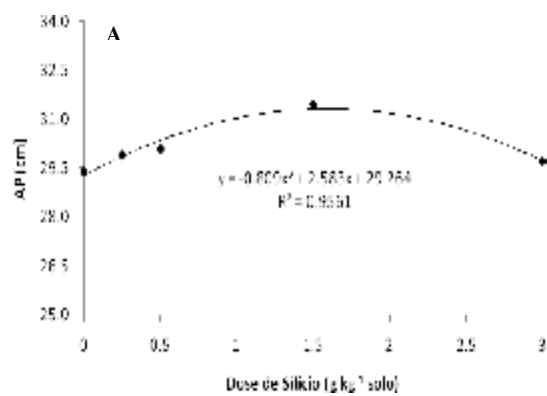
- 532 *salinidade e deficiência hídrica* Dissertação, Universidade Federal do Ceará,  
533 Fortaleza, Brasil.
- 534 Miranda, J. E., & Suassuna, N. D. (2004). *Guia de identificação e controle das principais*  
535 *pragas e doenças do algodoeiro - Circular Técnica*. Campina Grande - PB:  
536 Embrapa.
- 537 Moraes, S. R. G., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Carvalho, J. G., & Souza, P. E. (2009).  
538 Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de silício e  
539 cobre. *Acta Scientiarum Agronomy*, 31, 283-291.
- 540 Mori, T., Sakurai, M., & Sasuta, M. (2001). Effects of conditioned medium on activities of  
541 PAL, HS, DAHP syntase (DS-Co and Ds-Mn) and anthocyanin production in  
542 suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science*, 160, 355-360.
- 543 Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R.; Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. (1999).  
544 Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative  
545 metabolism in sorghum. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal* 11, 137-143.
- 546 Resende, R. S., Rodrigues, F. A., Soares, J. M., & Casela, C. R. (2009). Influence of  
547 silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant  
548 sorghum lines. *European Journal of Phytopathology*, 124, 533-541.
- 549 Rigano, L. A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M. R., Abramowicz, L., Torres, P. S.,  
550 Yun, M., Castagnaro, A. P., Oirdi, M., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J. M.,  
551 Bourab, K., & Vojnov, A. A. (2007). Bacterial cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucan acts in  
552 systemic suppression of plant immune responses. *The Plant Cell*, 19, 2077-2089.
- 553 Silva, I. T., Rodrigues, F. A., Oliveira, J. R., Pereira, S. C., Andrade, C. C. L. Silveira, R.  
554 P., & Conceição, M. M. (2010). Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by  
555 silicon. *Journal of Phytopathology*, 158, 253-262.

- 556 Suassuna, N. D., Chitarra, L. G., Asmus, G. L., & Inomoto, M. M. (2006). *Manejo de*  
557 *doenças do algodoeiro - Circular Técnica*. Campina Grande–PB, Brasil: Embrapa.
- 558 Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H., & Economou, A. (2004). Activity and isoforms of  
559 peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus*  
560 *cretica* L. *Journal of Plant Physiology*, 161, 69-77.
- 561 Urbanek, H.; Kuzniak-Gebarowska, E., & Herka, K. (1991). Elicitation of defense  
562 responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiology*  
563 *Plantarum*, 13, 43-50.
- 564 Van Rossum, M. W. P. C.; Alberda, M., & Van Der Plas, L. H. W. (1997). Role of  
565 oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science*, 130, 207-216.
- 566



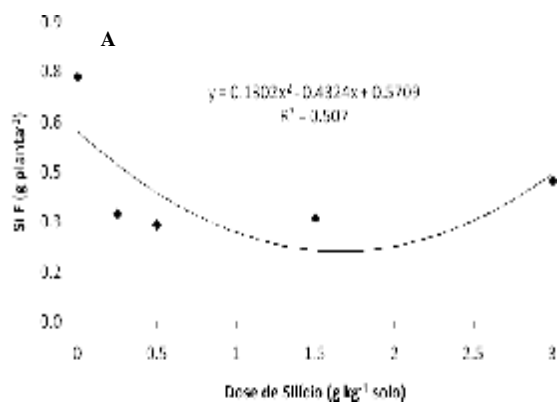
567

568 **Fig. 1** Severidade (SEV) da mancha-angular (A) e área abaixo da curva de progresso da doença  
 569 (AACPD) (B) em folhas de algodoeiro 10 dias após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp.  
 570 *malvacearum*, GO 10, em função de doses crescentes de SiO<sub>2</sub> aplicadas ao solo.  
 571

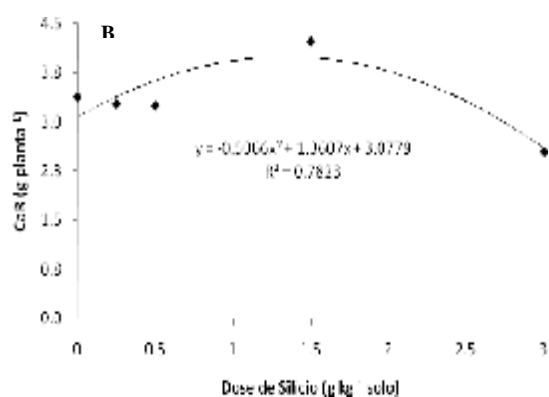


574

575 **Fig. 2** Altura da planta (AP) (A), biomassa fresca da folha (BFF) (B) e biomassa seca de folha  
 576 (BFS) (C) de plantas de algodoeiro aos 43 dias após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp.  
 577 *malvacearum*, GO 10, em função de doses crescentes de SiO<sub>2</sub> aplicadas ao solo.  
 578

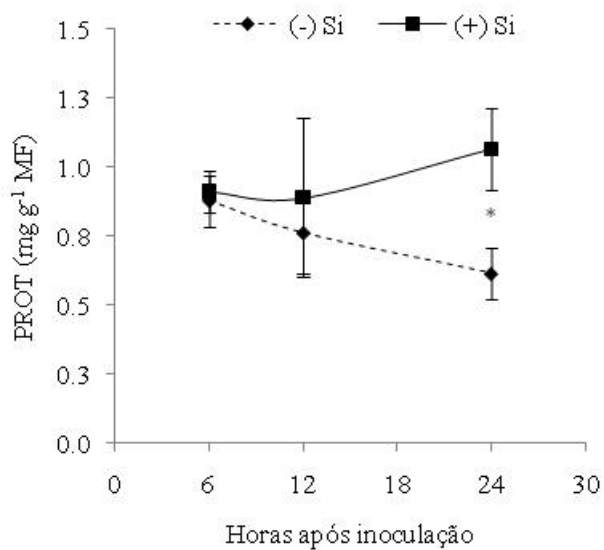


579



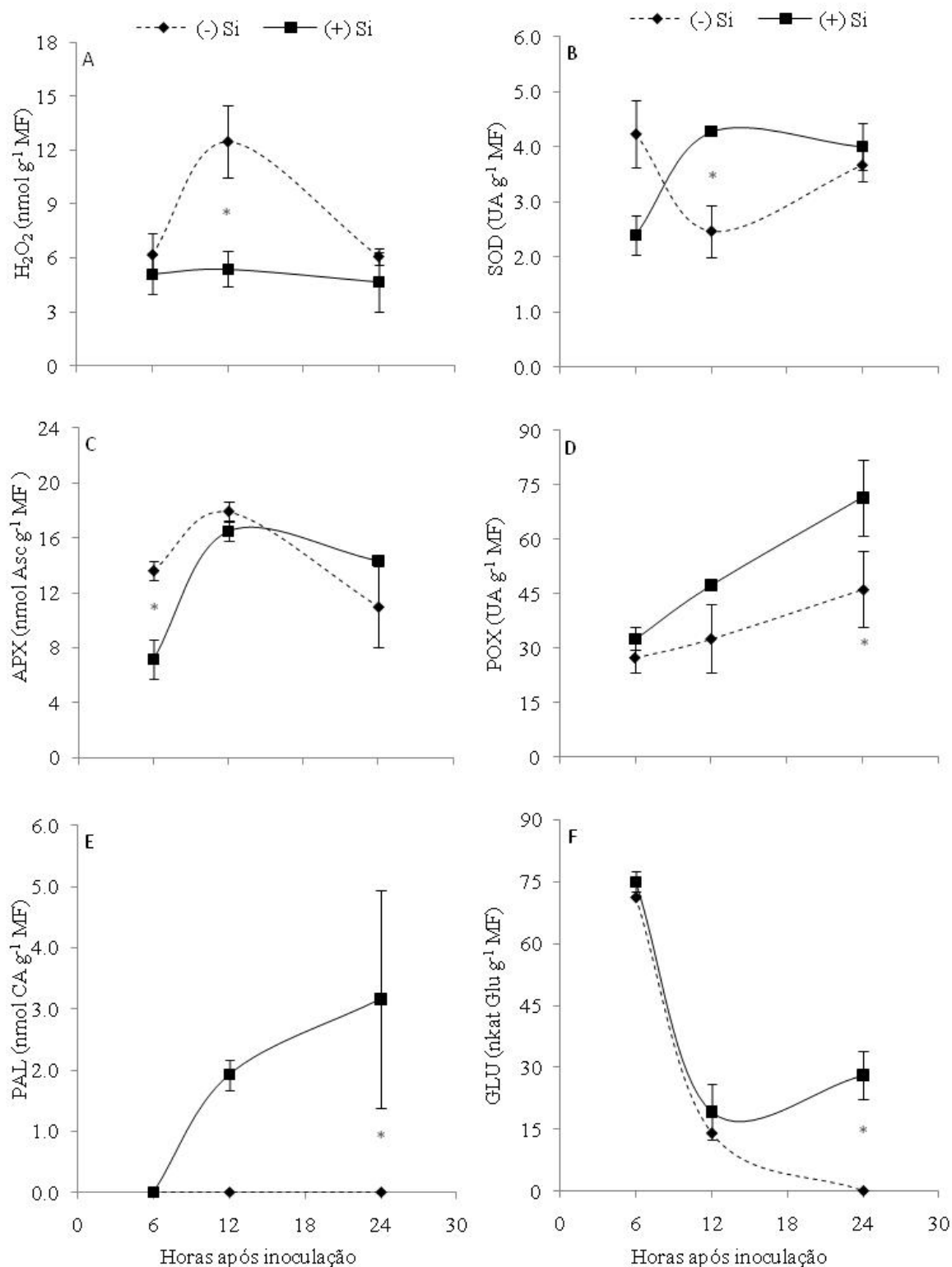
580

581 **Fig. 3** Contéudo de silício na folha (SiF) (A) e de cálcio na raiz (CaR) (B) de plantas de algodoeiro  
 582 43 dias após a inoculação com de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, GO 10, em função de  
 583 doses crescentes de SiO<sub>2</sub> aplicadas ao solo.  
 584



585

586 **Fig. 4** Teor de proteínas (PROT) em folhas de plantas de algodoeiro crescidas em solos com 0 (-Si)  
 587 ou 1,8 g de SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo (+Si) às 6, 12 e 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri*  
 588 subsp. *malvacearum*, GO 10. Cada ponto representa a média de três repetições. As barras  
 589 representam o desvio padrão das médias. Médias dos tratamentos (-Si) e (+Si) seguidas por um (\*)  
 590 diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.  
 591



592

593 **Fig. 5** Peróxido de hidrogênio e atividades enzimáticas em folhas de plantas de algodoeiro  
 594 crescidas em solos com 0 (-Si) ou 1,8 g de SiO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo (+Si) às 6, 12 e 24 horas após a  
 595 inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, GO 10. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
 596 (A), superóxido dismutase (SOD) (B), ascorbato peroxidase (APX) (C), peroxidase (POX) (D),  
 597 fenilalanina amônia-liase (PAL) (E) e glucanase (GLU) (F). Cada ponto representa a média de três  
 598 repetições. As barras representam o desvio padrão das médias. Médias dos tratamentos (-Si) e (+Si)  
 599 seguidas por um (\*) diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.



## **Conclusões Gerais**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- Com base na produção de enzimas, polissacarídeo, reação de hipersensibilidade, sensibilidade a cúpricos de uso agrícola, antibióticos e rep-PCR, a população de 100 isolados de *X. citri* subsp. *malvacearum* apresentou baixa variabilidade;
- O algodoeiro não acumulou silício na parte aérea;
- O silício não inibiu o crescimento “in vitro” de *X. citri* subsp. *malvacearum*;
- A severidade da mancha-angular do algodoeiro foi reduzida pela aplicação de silício via solo;
- Enzimas de estresse oxidativo e de defesa foram ativadas em plantas de algodoeiro tratadas com silício e inoculadas com *X. citri* subsp. *malvacearum*.