

**GISELE PEREIRA DOMICIANO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS DA  
RESISTÊNCIA DO ARROZ À BRUSONE MEDIADA PELO SILÍCIO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D669a  
2011

Domiciano, Gisele Pereira, 1982-  
Aspectos fisiológicos, bioquímicos e nutricionais da  
resistência do arroz à brusone mediada pelo silício / Gisele  
Pereira Domiciano. – Viçosa, MG, 2011.  
x, 92f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Fabricio de Ávila Rodrigues.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Arroz - Efeito do silício. 2. Brusone. 3. Fotossíntese.  
4. Fluorescência. 5. Clorofila. 6. Stress oxidativo. 7. Enzimas.  
8. Plantas - Nutrição. 9. Arroz - Doenças e pragas. 10. Arroz.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.189

**GISELE PEREIRA DOMICIANO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS DA  
RESISTÊNCIA DO ARROZ À BRUSONE MEDIADA PELO SILÍCIO**

**Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.**

**APROVADA: 31 de outubro de 2011**

---

**Francisco Xavier Ribeiro do Vale  
(Coorientador)**

---

**Luis Cláudio Vieira da Cunha**

---

**Hermínia Emília Prieto Martinez**

---

**Marta Cristina Corsi de Filippi**

---

**Fabricio de Ávila Rodrigues  
(Orientador)**

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”

*Charles Darwin*

*À Deus  
Aos meus pais, Delvair e Maria,  
A minha irmã Karyne,  
e ao Alexandre  
Por todo amor, por quem sou e por  
tudo que alcancei*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao CNPq pelo recurso financeiro para execução desse trabalho.

Aos professores Francisco Xavier Ribeiro do Vale e Fabrício de Ávila Rodrigues e Fábio Murilo DaMatta, pela amizade, incentivo e pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos professores Luis Cláudio Vieira da Cunha e Hermínia Emilia Prieto Martinez pelas sugestões e críticas apresentadas e pela disponibilidade em participar da banca de defesa dessa tese.

A pesquisadora da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Marta Cristina Corsi de Filippi, pela disponibilidade em participar da banca de defesa de tese, pelas sugestões e críticas apresentadas. Além disso, pelo envio das sementes de arroz e do isolado de *P. oryzae* usado neste estudo.

Ao Professor Gaspar H. Korndörfer da Universidade Federal de Uberlândia pela realização das análises da concentração foliar de silício.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pelos ensinamentos.

Ao Antônio Joaquim Macabeu pela amizade, pela ajuda e pelo compartilhamento de suas experiências durante esses anos de convívio.

Ao Bruno pela amizade e pela ajuda durante a condução dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos companheiros do Laboratório de Epidemiologia, Laboratório da Interação Planta-Patogéno e da Fisiologia Vegetal pela amizade e boa convivência durante esses anos.

Aos estudantes Isaias Cacique, Marcus Vinicius, Gustavo César, Gabriel Rino e Cecília Freitas pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Aos amigos Hyana Lima, Mirian Nogueira, Wilka e Renata Resende pela amizade, pelo auxílio e pelo convívio agradável.

A Kiki e ao Kin pela companhia e amor durante esses anos.

Aos meus pais, Delvair e Maria das Graças e a minha irmã Karyne, pelo carinho, apoio, ajuda, confiança e pelo referencial de dedicação, honestidade e perseverança.

Ao Alexandre pelo apoio constante, dedicação e amor.

À Deus, pela minha vida, pela saúde, força, coragem e pelas oportunidades que tem me proporcionado durante todo o decorrer da minha vida.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências .....	5
CAPÍTULO 1 .....	8
Resumo .....	9
Introdução .....	10
Material e Métodos .....	12
Material vegetal .....	12
Inoculação das plantas e avaliação da severidade da brusone .....	12
Mensuração das trocas gasosas em plantas de arroz infectadas por <i>P. oryzae</i> .....	13
Mensuração dos parâmetros da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	14
Determinação da concentração foliar de Si .....	15
Delineamento experimental e análise estatística dos dados .....	15
Resultados .....	15
Severidade da brusone, AACPB e concentração foliar de Si .....	15
Trocas gasosas em plantas supridas ou não com Si e inoculadas com <i>P. oryzae</i> .....	16
Trocas gasosas no período da manhã .....	16
Trocas gasosas no período da tarde .....	17
Fluorescência da clorofila <i>a</i> em plantas supridas ou não com Si e inoculadas com <i>P. oryzae</i> .....	17
Fluorescência da clorofila <i>a</i> no período da manhã .....	17
Fluorescência de clorofila <i>a</i> no período da tarde .....	18
Concentrações de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> e de carotenóides .....	19
Discussão .....	20
A infecção por brusone afeta os processos fisiológicos de plantas de arroz .....	20
O suprimento de Si alivia os efeitos da infecção pela brusone nos processos fisiológicos de plantas de arroz .....	24
Referências .....	28
CAPÍTULO 2 .....	49
Resumo .....	50
Introdução .....	51
Material e Métodos .....	52

Material vegetal .....	52
Inoculação das plantas e avaliação da severidade da brusone.....	53
Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de aldeído malônico (MDA) e da atividade da lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12) .....	54
Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e redutase da glutathiona (GR; EC 1.8.1.7) .....	55
Determinação da concentração foliar de Si.....	56
Delineamento experimental e análise estatística dos dados .....	56
Resultados.....	56
Progresso da brusone, AACPB e concentração foliar de Si:.....	56
Concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e de MDA e atividade da LOX.....	57
Atividades da CAT, APX, GR e SOD .....	57
Discussão.....	58
O sistema antioxidativo de plantas de arroz é afetado durante o processo infeccioso de <i>P. oryzae</i> .....	58
O suprimento de Si atenua o estresse oxidativo decorrente da infecção por <i>P. oryzae</i> em plantas de arroz .....	59
Referências .....	62
CAPÍTULO 3 .....	71
Resumo .....	72
Introdução.....	73
Material e Métodos .....	74
Determinação das concentrações foliares de Si, macronutrientes, micronutrientes e peso da matéria seca das plantas .....	76
Delineamento experimental e análise estatística dos dados .....	76
Resultados.....	76
Área Abaixo da Curva do Progresso da Brusone .....	76
Concentrações foliares de Si e de macro e micronutrientes .....	77
Discussão.....	79
Referências .....	83
CONCLUSÕES GERAIS .....	92

## RESUMO

DOMICIANO, Gisele Pereira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro 2011. **Aspectos Fisiológicos, Bioquímicos e Nutricionais da Resistência do Arroz à Brusone Mediada pelo Silício**. Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues. Coorientadores: Fabio Murilo DaMatta e Francisco Xavier Ribeiro do Vale

O patossistema arroz-*Pyricularia oryzae* tem sido amplamente estudado no intuito de desenvolver novos métodos de manejo da doença e de entender a interação planta-patógeno. Neste contexto, a fim de se reduzir os danos causados pela doença, inúmeras estratégias, incluindo a aplicação de silício (Si), têm sido adotadas nos últimos anos. No entanto, são raros os trabalhos avaliando o efeito da doença, na presença do Si, nos processos fisiológicos das plantas. Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar o efeito da infecção por *P. oryzae* nos processos de trocas gasosas e fluorescência de clorofila *a* de plantas de arroz ao longo de todo o processo infeccioso e verificar o efeito da aplicação do Si nesses mesmos parâmetros em plantas inoculadas. Além disso, estudar o efeito da brusone em plantas de arroz supridas ou não com Si no estresse oxidativo por meio da quantificação das atividades de Catalase, Superóxido desmutase, Glutathione redutase. Nossos resultados indicam que a doença em plantas suscetíveis e não supridas com Si principalmente em estágios mais avançados de infecção, causa queda na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, e que essa queda parece estar associada tanto relacionada a fixação do CO<sub>2</sub>, como a danos no aparato fotossintético. Em contrapartida, os resultados demonstram também que o silício tem um papel importante na manutenção de níveis adequados de condutância estomática e taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, na proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição crônica e do fotossistemas contra danos decorrentes da hiperexcitação crônica. A brusone induz a ocorrência de

estresse oxidativo como forma de acelerar a morte celular e que esta indução ocorre por meio da inibição da fotossíntese, por meio da indução da ação SOD e limitação na atividade de catalases e de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa impedindo assim a detoxificação do  $H_2O_2$ . Por outro lado o Si parece aliviar o estresse oxidativo induzido pela brusone regulando o nível de  $H_2O_2$  por meio de repressão a ação SOD, estimulando a atividade de catalases e de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa. O perfil nutricional de plantas de arroz em função do suprimento de Si e/ou da inoculação de *P. oryzae*. Os resultados desse estudo indicam que tanto a infecção por *P. oryzae* quanto o suprimento de Si reduz de maneira geral a concentração de macro e micronutrientes. Embora a concentração de nutrientes em plantas supridas com Si tenha decrescido estes estão dentro da faixa considerada adequada para cultura. O crescimento e desenvolvimento de plantas supridas com Si é maior que em plantas não supridas com esse elemento. Sendo assim a resistência mediada pelo Si de plantas de arroz a infecção de *P. oryzae*, não esta relacionada com aumentos na concentração de nutrientes e sim redução na concentração dos mesmos.

## ABSTRACT

DOMICIANO, Gisele Pereira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2011. **Physiological, biochemical and nutritional aspects of the rice blast resistance mediated by silicon**. Advisor: Fabrício Ávila Rodrigues. Co-advisors: Fabio Murilo DaMatta and Francisco Xavier Ribeiro do Vale

The pathosystem rice-*Pyricularia oryzae* has been widely studied aiming the development of new disease manage practices and the understanding of the plant-pathogen interactions. In this context, to reduce the losses caused by the disease, numerous strategies, including the application of silicon (Si), have been adopted over the last years. However, studies that try to elucidate how the disease affects the host physiology in the presence of silicon are scarce. Then, the objective of this work was to verify the effect of the *P. oryzae* infection on the gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence processes of rice plants throughout the whole infection process, and also to verify the effect of Si application on the same parameters in inoculated plants. Moreover, this study aimed at elucidating how the blast disease affects the oxidative stress, by measuring the activities of catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, and nutrient intake in rice plants supplied or not with Si. Our results indicate that the disease in susceptible plants not supplied with Si, especially in advanced stages of the infection, causes significant reductions in the net CO<sub>2</sub> assimilation rate, and this reduction seems to be associated with reduced CO<sub>2</sub> fixation and to damages to the photosynthetic apparatus. On the other hand, the results also indicate that Si has a relevant role in maintaining the adequate levels of stomatal conductance and the net CO<sub>2</sub> assimilation rate. Si also seems to play a role in the protection of the photosynthetic apparatus against chronic photoinhibition and hyper excitation.

The results also demonstrate that the blast disease induces the occurrence of oxidative stress as a way to accelerate the cellular death, and that this induction occurs through inhibition of the photosynthesis, stimulus to the SOD activity and limitation of the activities of catalases and enzymes of the ascorbate- glutathione cycle. This blocks the detoxification of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, that accumulates in the cells. Si application seems to relief the oxidative stress induced by the blast disease by regulating the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through the repression of SOD, and stimulating the catalases and enzymes of the ascorbate- glutathione cycle. The nutritional profile of rice plants with regards to Si application and/or inoculation of *P. oryzae* indicate that both infection, and Si application, contribute to general reductions in macro and micronutrients concentrations. Although reduced, it must be emphasized that the nutrient levels here detected are within the normal range for the culture. Growing and development of rice plants supplied with Si were however; more pronounced than in plants not supplied with this element, even though +Si plants presented inferior nutrients concentrations when compared to – Si plants. These results finally demonstrate that rice blast resistance mediated by Si, is not related to enhanced accumulation of nutrients, but rather to reduced nutrient accumulation.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é responsável por 70% do consumo diário de alimento pela população mundial. É um dos alimentos com melhor balanço nutricional fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem. É também uma cultura extremamente versátil, adaptando-se a diferentes condições de solo e clima, além de apresentar maior potencial para o combate a fome no mundo (Kochian et al., 2004). Porém, este cereal é suscetível a inúmeras doenças, sendo a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* [T.T.Hebert (Yaegashi & Udagawa) Barr, anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc], a mais importante (Kawasaki, 2004). A brusone torna-se importante para causar perdas na produção quando os cultivos são estabelecidos utilizando-se cultivares suscetíveis e em condições ambientais favoráveis à ocorrência de epidemias da doença (Kawasaki, 2004). Uma primeira linha de estudos busca obter novos métodos de manejo da brusone (Jia et al., 2004) enquanto que outra busca o entendimento da interação planta-patógeno (Ohashi et al., 2006).

Neste contexto, a fim de reduzir os danos causados pela brusone, inúmeras estratégias têm sido adotadas nos últimos anos. Entre essas, esta o uso do de silício (Si), uma vez que esse elemento aumenta a resistência de várias espécies de plantas a estresses abióticos e bióticos (Liang et al., 2007; Ma & Yamaji, 2006). Importantes doenças em cevada, milho, pepino, uva, morango e arroz têm sido eficientemente controladas pelo suprimento de Si (Datnoff et al., 2007). Especificamente no caso do arroz, já foi demonstrado que muitos dos componentes de resistência foram significativamente reduzidos adicionando-se fontes de Si no solo (Datnoff et al., 2007; Seebold et al., 2001). Além disso,

existem evidências de que o Si pode atuar ativando respostas de defesa pós-formadas, como fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese, possuindo desse modo não só um papel passivo, mas também ativo (Rodrigues et al., 2003; 2005). Corroborando essas evidências, recentemente foi demonstrado que a aplicação de Si acarreta modificações no padrão de expressão gênica em plantas de arroz, sendo muitos dos genes de expressão alterada relacionados a processos de defesa e ao metabolismo oxidativo, indicando uma complexa rede de atuação desse elemento (Brunings et al., 2009).

Acredita-se que as perdas em produtividade decorrentes da infecção pelo fungo hemibiotrófico *P. grisea* podem estar relacionadas, principalmente, a alterações nos processos fisiológicos das plantas, alterações deletérias na fotossíntese, respiração e acúmulo de açúcares ou a ação de toxinas não específicas que são citotóxicas. Burrell & Rees (1974) e Padhi et al., (1978) pioneiramente demonstraram o efeito negativo da infecção por *P. grisea* na fotossíntese líquida em folhas de arroz. Ambos os trabalhos observaram uma redução na fotossíntese de plantas inoculadas quando comparadas com plantas saudáveis. Recentemente tem se demonstrado que mudanças na resistência estomática e mesofílica ao influxo de CO<sub>2</sub> nas taxas das reações bioquímicas da fotossíntese e no número estrutura de cloroplastos estão associadas a reduções na taxa fotossintética em plantas quando infectadas por fitopatógenos (Alves et al., 2011; Domiciano et al., 2009; Pinkard & Mohammed, 2006). Bastiaans (1991) também demonstrou que a brusone reduziu a fotossíntese não apenas através de uma redução na área foliar verde, mas também em tecidos verdes assintomáticos denominadas de lesões virtuais. Em plantas expostas a estresses, sejam eles de origem biótica ou abiótica, é comum a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diferentes compartimentos celulares incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e apoplasto (Mittler, 2002). Os efeitos do estresse oxidativo são variáveis, pois perturbações pequenas no equilíbrio redox são rapidamente eliminadas ao passo que perturbações de maior escala podem levar à morte celular devido a produção de peróxidos e radicais livres que danificam a maioria dos componentes celulares (Foyer et al., 1994). As EROs podem causar ainda peroxidação de lipídios (Liang,

1999; Mittler, 2002) o que acaba por alterar a permeabilidade das membranas celulares e, conseqüentemente, a homeostase celular. No caso de plantas atacadas por fitopatógenos, as EROs têm também papel relevante nos mecanismos de defesa, pois além de seu efeito antimicrobiano direto (Resende et al., 2003) podem estimular (via sinalização redox) outros mecanismos de defesa tais como a produção de lignina e fitoalexinas e a resposta de hipersensibilidade (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997). A remoção ou detoxificação das EROs é realizada por meio de um sistema antioxidativo complexo que é o responsável pela manutenção e pelo balanço das EROs nas células de plantas. Esse sistema tem tanto componentes enzimáticos quanto não enzimáticos (Arora et al., 2002). No que concerne os componentes enzimáticos, a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutatona (GR) são as principais enzimas envolvidas na detoxificação das EROs ao passo de que a glutatona e ácido ascórbico são os principais metabólitos não enzimáticos envolvidos na detoxificação das EROs (Arora et al., 2002).

Recentemente foi relatado por Sun et al., (2010) que no patossistema arroz-*P. grisea* o suprimento de Si parece estar relacionada a alteração nas atividades de enzimas e metabólitos do sistema antioxidante como a CAT, a lipoxigenase (LOX) e o aldeído malônico (MDA). Esses mesmos autores propuseram que plantas de arroz responderam ao suprimento de Si com um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e na peroxidação de lipídios, o qual esteve associado com a ativação de mecanismos de defesa nas plantas. Em plantas de pepino supridas com Si e infectadas por *Phytophthora melonis* ocorreu decréscimo na permeabilidade das membranas das raízes e redução da peroxidação de lipídios ao contrário do observado para as plantas não supridas com esse elemento (Mohaghegh et al., 2011). Além disso, verificou-se que o Si proporcionou um aumento na atividade das enzimas CAT e SOD (Mohaghegh et al., 2011). O papel do Si em atenuar condições de estresse abiótico como salinidade e toxicidade do boro também tem sido investigado (Gunes et al., 2007). Nesses casos, demonstrou-se que o Si contribuiu para a manutenção de muitas das funções fisiológicas e bioquímicas das plantas tais como atividade da

LOX, SOD, CAT e APX, aliviando assim o estresse oxidativo (Gunes et al., 2007).

Além do efeito fisiológico, as doenças podem causar nas plantas um desbalanço nutricional influenciando diretamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Taiz & Zeiger 2004). A nutrição mineral pode exercer efeitos no progresso das doenças podendo aumentar ou diminuir a suas intensidades (Walters & Bingham, 2007). Porém os mecanismos que levam a esta desordem e desbalanço são complexos e multivariados. A nutrição mineral tem sido considerada uma opção no manejo integrado das doenças de plantas (Huber, 1981). No entanto, são poucos os trabalhos que buscam associar a infecção por patógenos com o status nutricional das plantas na presença de Si. Tamai & Ma (2008) estudando o efeito do Si em cultivos de arroz em campo usando plantas mutantes defectivo na absorção desse elemento mediada por dois transportadores *Lsi<sub>1</sub>* e *Lsi<sub>2</sub>* e plantas do tipo selvagem observaram que as concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) foram similares tanto nas plantas do mutante quando do tipo selvagem nos diferentes estágios de crescimento indicando, assim, que o Si não interferiu na absorção e nem mesmo na concentração foliar desses nutrientes. Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada no peso da matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas do mutante e do tipo selvagem. Posteriormente, Gao et al., (2011) demonstraram que a absorção de potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe) em plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *P. oryzae* foi afetada, mas não apresentaram informações referentes aos outros sete nutrientes essenciais (Taiz & Zeiger, 2004).

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram verificar o efeito do Si e da infecção de plantas de arroz por *P. oryzae* nos processos de trocas gasosas e fluorescência de clorofila *a*, na atividade das enzimas do estresse oxidativo e no status nutricional das plantas.

## Referências

- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1831-1839
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants *Current Science* 82: 1227-1238
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 299-321
- Bastiaans L (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* 81: 611-615
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol* 155: 161-170
- Burrell MM, Rees T (1974) Carbohydrate metabolism of rice leaves infected by *Pyricularia oryzae*. *Physiol Plant Pathol* 4: 489-496
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW (2007) Silicon and Plant Disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St Paul, MN, USA, pp 233-246
- Domiciano GP, Resende RS, Rodrigues FA, DaMatta FM (2009) Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 17: 305-339
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plantarum* 92: 696-717
- Gao D, Cai K, Chen J, Luo J, Zeng R, Yang R, Zhu X (2011) Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. *Acta Physiology Plantarum* 33: 675-682

- Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O (2007) Silicon increases boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron. *Biol Plantarum* 51: 571-574
- Huber DM (ed) (1981) The role of mineral nutrients and agricultural chemicals in the incidence and severity of take-all, London
- Jia YL, Wang ZH, Fjellstrom RG, Moldenhauer KAK, Azam MA, Correll J, Lee FN, Xia YW, Rutger JN (2004) Rice *Pi-ta* gene confers resistance to the major pathotypes of the rice blast fungus in the United States. *Phytopathology* 94: 296-301
- Kawasaki S (ed) (2004) Proceedings of the 3rd International Rice Blast Conference. Rice Blast: Interaction with Rice and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA (2004) How the crops plants tolerate acids soils. Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review Plant Biology* 55: 459-493
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Phys* 48: 251-275
- Liang YC (1999) Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant Soil* 209: 217-224
- Liang YC, Sun WC, Zhu YG, Christie P (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environ Pollut* 147: 422-428
- Ma JF, Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci* 11: 392-397
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh AH, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N (2011) Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Dis* 95: 455-460
- Ohashi Y, Kuroda K, Sasaki K, Iwai T, Yazaki Y, Hiraga S, Seo S, Mitsuohara I, Minami E (2006) Rapid defense gene expression in both resistant and susceptible rice cultivars by elicitor(s) originating from conidia of blast fungus

- Basal resistance response before fungal penetration into host cells. *Physiol Mol Plant P* 69: 13-25
- Padhi B, Chakrabarti NK, Nayak SK (1978) Effect of Blast Infection on Photosynthetic Activity of Rice Seedlings. *Biol Plantarum* 20: 418-420
- Pinkard EA, Mohammed CL (2006) Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-127
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM (2003) Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93: 535-546
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 144-159
- Seebold KW, Kucharek TA, Datnoff LE, Correa-Victoria FJ, Marchetti MA (2001) The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91: 63-69
- Sun WC, Zhang J, Fan QH, Xue GF, Li ZJ, Liang YC (2010) Silicon-enhanced resistance to rice blast is attributed to silicon-mediated defence resistance and its role as physical barrier. *Eur J Plant Pathol* 128: 39-49
- Taiz L, Zeiger E (eds) (2004) *Fisiologia vegetal*, Porto Alegre
- Tamai K, Ma J (2008) Reexamination of silicon effects on rice growth and production under field conditions using a low silicon mutant. *Plant and Soil* 307: 21-27
- Walters DR, Bingham IJ (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals Applied Biology* 151: 307-324

## **CAPÍTULO 1**

### **ALTERAÇÕES NOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DE PLANTAS DE ARROZ INFECTADAS POR *Pyricularia oryzae* E SUPRIDAS COM SILÍCIO**

**Resumo** - O patossistema arroz-*Pyricularia oryzae* tem sido amplamente estudado no intuito de desenvolver novos métodos de manejo da doença e de entender a interação planta-patógeno. Neste contexto, a fim de se reduzir os danos causados pela doença, inúmeras estratégias, incluindo a aplicação de silício (Si), têm sido adotadas nos últimos anos. No entanto, são raros os trabalhos avaliando o efeito da doença, na presença do Si, nos processos fisiológicos das plantas. Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar o efeito da infecção por *P. oryzae* nos processos de trocas gasosas e fluorescência de clorofila *a* de plantas de arroz ao longo de todo o processo infeccioso em plantas não supridas com Si e verificar o efeito da aplicação do Si nessas mesmas variáveis em plantas inoculadas. Nossos resultados indicam que a doença em plantas suscetíveis e não supridas com Si parece e principalmente em estágios mais avançados de infecção, causa queda na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, redução na fotossíntese e que essa queda parece estar associada tanto a limitações físicas, como diminuição da quantidade de tecido verde, quanto a limitações de ordem bioquímica, como o impedimento bioquímico a fixação do CO<sub>2</sub>, e também a danos no aparato fotossintético, danos resultantes da fotoinibição crônica da fotossíntese e do estado de hiperexcitação crônica. Em contrapartida, os resultados demonstram também que o silício tem um papel importante na manutenção de níveis adequados de condutância estomática e taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, na proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição crônica e do fotossistemas contra danos decorrentes da hiperexcitação crônica.

## Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é suscetível à inúmeras doenças sendo a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* [T.T.Hebert (Yaegashi & Udagawa) Barr, anamorfo *Pyricularia P. oryzae* (Cooke) Sacc], a mais importante (Kawasaki, 2004). Sobretudo quando os cultivos são estabelecidos utilizando-se cultivares suscetíveis e em condições ambientais favoráveis à ocorrência da brusone, às perdas têm sido significativas (Kawasaki, 2004). Uma primeira linha de estudos busca obter novos métodos de manejo da brusone (Jia et al., 2004); enquanto que outra busca o entendimento da interação planta-patógeno (Ohashi et al., 2006).

Neste contexto, a fim de se reduzir os danos causados pela brusone, inúmeras estratégias têm sido adotadas nos últimos anos. Entre essas inclui o uso do silício (Si), uma vez que esse elemento aumenta a resistência de várias espécies de plantas a estresses abióticos e bióticos (Liang et al., 2007; Ma & Yamaji, 2006). Importantes doenças em cevada, milho, pepino, uva, morango e arroz têm sido eficientemente controladas pelo suprimento de Si (Datnoff et al., 2007). Especificamente no caso do arroz, já foi demonstrado que muitos dos componentes de resistência foram significativamente reduzidos com a adição de doses crescentes de Si no solo (Seebold et al., 2001). O modo de ação deste elemento na interação da planta com o patógeno, no entanto, ainda não está bem esclarecido (Datnoff et al., 2007). Já foi demonstrado que no patossistema arroz-*P. grisea*, o suprimento de Si aumenta o número de células buliformes longas e curtas na epiderme das folhas, além da sua deposição abaixo da cutícula (Kim et al., 2002). Ao depositar principalmente no lúmen das células, na parede celular e espaços intercelulares (Yoshida et al., 1962), o ácido monossilícico forma uma barreira mecânica que impede a penetração de patógenos (Fauteux et al., 2005). Além disso, existem evidências de que o Si pode atuar potencializando respostas de defesa pós-formadas, e.g. fitoalexinas e proteínas PRs, possuindo desse modo não só um papel passivo (barreira física), mas também um papel ativo (Rodrigues et al., 2003a; 2004a; 2004b; 2004c; 2005). Recentemente foi demonstrado que a aplicação de Si acarreta modificações no padrão de expressão gênica em plantas de arroz (Brunings et al., 2009), sendo muitos dos genes de expressão alterada

relacionados a processos de defesa e ao metabolismo oxidativo indicando uma complexa rede de atuação desse elemento.

Acredita-se que as perdas em produtividade decorrentes da infecção pelo fungo hemibiotrófico *P. grisea* podem estar relacionadas, principalmente, a alterações nos processos fisiológicos das plantas, alterações deletérias na fotossíntese, respiração e acúmulo de açúcares, ação de toxinas citotóxicas não específicas. Burrell & Rees (1974) e Padhi et al., (1978) pioneiramente demonstraram o efeito negativo da infecção por *P. grisea* na fotossíntese líquida de folhas de arroz. Ambos os trabalhos observaram uma redução na fotossíntese de plantas inoculadas quando comparadas com plantas saudáveis. Recentemente tem se demonstrado que mudanças na resistência estomática e mesofílica ao influxo de CO<sub>2</sub>, nas taxas das reações bioquímicas da fotossíntese e no número e estrutura dos cloroplastos estão associadas a reduções na taxa fotossintética em plantas infectadas por fitopatógenos (Alves et al., 2011; Domiciano et al., 2009; Pinkard & Mohammed, 2006). Além disso, tem se verificado que a secreção de toxinas em tecidos assintomáticos também é um dos mecanismos pelos quais os patógenos impactam negativamente as taxas fotossintéticas (Pinkard & Mohammed, 2006). Coerentemente, Bastiaans (1991) demonstrou que a brusone reduz a fotossíntese não apenas através de uma redução na área foliar verde, mas também em tecidos verdes assintomáticos (lesão virtual). No entanto, nenhuma evidência de como a doença de fato interfere no metabolismo dos tecidos assintomáticos foi apresentado pelo autor.

Considerando a limitação dos estudos disponíveis na literatura e a disponibilidade de novas tecnologias que permitem avaliar em paralelo os parâmetros relacionados às trocas gasosas e a fluorescência de clorofila *a*, novos estudos são necessários a fim de se verificar o efeito da infecção por *P. oryzae* na fisiologia da planta de arroz. Adicionalmente, em um patossistema modelo como o arroz-*P. oryzae* onde comprovadamente o Si afeta negativamente o progresso da brusone, estudos que avaliem o efeito desse elemento nos parâmetros fisiológicos das plantas de arroz com sintomas da brusone são necessários. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram verificar o efeito da infecção por *P. oryzae* nos

processos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz supridas ou não com Si.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal**

Sementes de arroz (cv. Metica-1) foram submetidas à desinfestação superficial com uma solução de 10% vol de NaOCl por 3 min. Em seguida, as sementes foram lavadas em água estéril e semeadas em bandejas contendo areia. Aos 5 dias após germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 litros de solução nutritiva a 1/2 força iônica. A solução nutritiva foi baseada naquela desenvolvida por Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e incluíram os macronutrientes: 1 M/L KNO<sub>3</sub>, 0,25 M/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M/L NH<sub>4</sub>Cl, 1 M/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, e 1,0 M/L Ca<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>).4H<sub>2</sub>O e os seguintes micronutrientes: 0,30 mM/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,33 mM/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 11,5 mM/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,5 mM/L MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,1 mM/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 25 mM/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 25 mM/L EDTA Bisódico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total, adicionando-se ou não o ácido monossilícico. O ácido monossilícico, usado como fonte de Si, foi preparado passando o silicato de potássio em resina de troca catiônica (Amberlite IR-120B, H<sup>+</sup> forma; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2001). As doses de Si usadas foram 0 ou 2 mM/L. A solução nutritiva, sem aeração, foi trocada a cada quatro dias e o pH verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0 usando HCl ou NaOH M quando necessário.

### **Inoculação das plantas e avaliação da severidade da brusone**

As plantas de arroz foram inoculadas aos 45 dias, quando possuíam o terceiro e quarto de folhas completamente expandidos, após o transplântio para solução nutritiva com um isolado monospórico de *P. oryzae* (CNPAF-1048) cedido pela EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás. O isolado foi preservado em papel filtro e armazenado em freezer a -20°C. Pedacos de papel filtro contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-água (BDA). Após

10 dias, discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio de aveia e armazenadas a 25°C por 15 dias. Após esse período, as placas contendo o micélio do fungo foram submetidas à raspagem superficial e deixadas abertas expostas a luz contínua por 3 dias para a produção de conídios. A suspensão de conídios foi obtida pela adição de, aproximadamente, 10 mL de água destilada com 1% (p/v) de gelatina, em cada placa, seguido de raspagem superficial com um pincel de cerdas macias. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em gaze para remoção de micélio e fragmentos de BDA. Em seguida, a concentração da suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^5$  conídios/ml em hemacitômetro. Foi adicionado Tween 80 (0,1/100 ml) de suspensão para reduzir a tensão superficial na superfície foliar. A inoculação das plantas foi realizada com aerógrafo pressurizado (Paasche Airbrusch Co., Chicago, EUA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade relativa de  $90 \pm 5\%$ , temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro.

A severidade da brusone foi avaliada às 36, 60, 84, 108 e 132 horas após inoculação (hai) no terceiro e quarto folha d perfilho principal utilizando-se a escala proposta pelo “International Rice Research Institute” (IRRI, 1996). Os dados obtidos foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB) por meio de integração trapezoidal (Shaner & Finney, 1977).

### **Mensuração das trocas gasosas em plantas de arroz infectadas por *P. oryzae***

As determinações dos parâmetros relacionados às trocas gasosas foram realizadas nos períodos da manhã (das 7 às 10 horas) e da tarde (das 12 às 14 horas) utilizando-se um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400 Nebraska, EUA) em sistema aberto. Os parâmetros estimados mensuradas foram: condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), a razão entre a concentração interna e ambiente de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) e a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ). As mensurações foram realizadas em casa de vegetação onde as concentrações de CO<sub>2</sub> variavam entre 380 a 400 ppm utilizando radiação fotossinteticamente ativa de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Durante as avaliações, a temperatura ambiente variou de 19 a 28°C e a temperatura da folha variou entre 24 entre 32°C. As avaliações foram realizadas no terceiro e quarta folha

completamente expandidas de acordo com a escala de crescimento das plantas da repetição de cada tratamento. O terceiro quarto par de folhas completamente expandidas de dois perfilhos foram previamente marcadas com fita plástica para permitir que as medições ocorressem no mesmo local. Pela manhã, as avaliações das trocas gasosas foram realizadas às 36, 60, 84, 108 e 132 hai e pela tarde às 42, 66, 90, 114 e 138 hai. As trocas gasosas também foram avaliadas em plantas não inoculadas com *P. oryzae*. As leituras foram registradas apenas quando os valores de  $A_{máx}$  e  $g_s$  tornaram-se estáveis.

### **Mensuração dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a***

As avaliações da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no período da manhã e, posteriormente, essas mesmas avaliações foram realizadas no período da tarde. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram determinados paralelamente as medições das trocas gasosas nos mesmos horários e nas mesmas folhas descritos anteriormente utilizando-se um fluorômetro de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). Após um período de adaptação ao escuro de 30 min, os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz ( $1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante de irradiância de  $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi aplicado por 1 s para garantir a máxima emissão de fluorescência ( $F_m$ ). Com base nos valores de  $F_0$  e  $F_m$ , calculou-se a razão  $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$ , a qual expressa a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII). A estimação da taxa de transporte de elétrons (TTE), da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII ( $F_v'/F_m'$ ), dos coeficientes de extinção fotoquímica ( $q_p$ ) e não-fotoquímica (NPQ) foi realizada conforme descrito por Lima et al. (2002).

### **Determinação da concentração de clorofila *a*, *b* e de carotenóides**

Amostras foliares do terceiro e quarto par de folhas completamente expandidas das plantas da repetição de cada tratamento foram coletadas às 0, 36, 60, 84, 108, 132 hai e armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de acetona a 80% (v/v). As

amostras foram quantificadas espectrofotometricamente a 470; 646,8 e 663,2 nm e as concentrações de clorofilas *a*, *b* e de carotenóides foram calculadas a partir de fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987).

### **Determinação da concentração foliar de Si**

Parte da terceira e quarta folha completamente expandida do perfilho principal das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água deionizada, secas em estufa por um período de 72 horas a 65°C e, posteriormente, trituradas em moinho tipo Thomas-Wiley. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica (Korndörfer et al., 2004).

### **Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e os tratamentos consistiam em duas doses de si, 0 e 2mM/L. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas de arroz. O experimento foi conduzido duas vezes. Os dados referentes a cada variável foram combinados depois de confirmada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett (Gomez & Gomez, 1994). As médias obtidas para os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, assim como para as concentrações de clorofila *a* e *b*, carotenóides e de Si foram comparadas pelo teste *t* ( $P \leq 0,05$ ) usando o software STATISTICA (StatSoft, 2004). A severidade da brusone e os dados dos variáveis fotossintéticas foram correlacionados, bem como a AACPB com a concentração foliar de Si.

## **Resultados**

### **Severidade da brusone, AACPB e concentração foliar de Si**

A severidade da brusone foi reduzida pelo suprimento de Si durante todo o período avaliado (Fig.1A). Em plantas de arroz não supridas com Si, a severidade final foi de 33%. Em plantas supridas com esse elemento durante o mesmo período avaliado, a severidade atingiu 5,6% (Fig. 1A). A AACPB em plantas supridas com Si foi reduzida em 89% em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 1B). A concentração foliar de Si em plantas supridas com esse

elemento foi de 4,7 dag/kg (Fig. 2), sendo 714% superior em relação ao obtido para as plantas não supridas com Si.

### **Trocas gasosas em plantas supridas ou não com Si e inoculadas com *P. oryzae***

#### **Trocas gasosas no período da manhã**

A  $g_s$  de plantas não supridas com Si foi reduzida durante o progresso da brusone (Fig. 3A). Verificou-se que entre 0 e 36 hai, houve um acentuado decréscimo na  $g_s$ . Posteriormente, apesar de uma ligeira queda, os valores de  $g_s$  tenderam a permanecer constantes até às 132 hai. Considerando plantas supridas com Si, apesar da tendência inicial de queda nos valores de  $g_s$  durante o progresso da brusone, após às 84 hai, observou-se que os valores aumentaram. No entanto, diferenças significativas para  $g_s$  entre plantas supridas ou não com Si ocorreram apenas as 108 e 132 hai (Fig. 3A). Destaca-se que em plantas não supridas com Si,  $g_s$  correlacionou-se negativamente e significativa com a severidade da brusone (Tabela 2). Não houve correlação entre severidade e  $g_s$  em plantas supridas com Si (Tabela 1). Concomitantemente aos decréscimos observados para  $g_s$ , verificou-se que  $E$  decresceu ao longo de todo o período avaliado independentemente da presença ou não de Si (Fig. 3B). Houve correlação positiva e significativa entre  $g_s$  e  $E$  (Tabela 1). Ao se comparar as curvas de  $E$  de plantas supridas ou não com Si, verificou-se novamente que diferenças significativas ocorreram após as 84 hai. Coerentemente, além de correlação entre  $g_s$  e  $E$ , verificou-se também correlação negativa e significativa entre  $E$  e a severidade da brusone em plantas não supridas com Si (Tabela 2). Não houve correlação significativa entre  $E$  e severidade em plantas supridas com Si (Tabela 1).

A relação  $C_i/C_a$  permaneceu com poucas variações até às 84 hai tanto em plantas supridas e não supridas com Si. Após esse período, observou-se ainda um aumento significativo desta razão em plantas supridas com Si. (Fig. 3C). Houve correlação positiva e significativa entre  $C_i/C_a$  e severidade tanto em plantas supridas ou não supridas com esse elemento (Tabelas 1 e 2).

A  $A_{máx}$  foi reduzida em decorrência da infecção por *P. oryzae*, independentemente do suprimento de Si (Fig. 3D). Em plantas supridas com Si, esta redução foi de 47% ao passo que em plantas não supridas com esse elemento

a redução atingiu 81% em relação às plantas sadias. Diferenças significativas entre plantas supridas ou não com Si foram observadas a partir das 84 hai. Houve correlação negativa e significativa entre a  $A_{máx}$  e severidade da brusone tanto em plantas supridas ou não supridas com Si.

### **Trocas gasosas no período da tarde**

Verificou-se que a  $g_s$  de plantas não supridas com Si também foi reduzida durante o progresso da brusone (Fig. 4A). Às 42 hai houve um acentuado decréscimo em  $g_s$  seguido de ligeira queda até às 138 hai. Considerando as plantas supridas com Si, apesar da tendência de queda nos valores de  $g_s$  durante o progresso da brusone após as 66 hai, os valores mantiveram-se estáveis. Diferenças significativas para  $g_s$  entre plantas supridas ou não com Si ocorreram às 42, 66, 114 hai (Fig. 4A). Independentemente do suprimento de Si, houve correlação negativa e significativa entre  $g_s$  e severidade (Tabela 3 e 4).

De modo semelhante ao observado no período da manhã, a  $E$  decresceu durante o progresso da brusone em plantas não supridas com Si (Fig. 4B). Já em plantas supridas com esse elemento,  $E$  decresceu até às 42 hai e permaneceu estável até às 138 hai. Houve correlação positiva e significativa entre  $g_s$  e  $E$  tanto em plantas supridas ou não com Si (Tabelas 3 e 4). Ao se comparar, no entanto, as curvas de  $E$  de plantas supridas ou não com Si (Fig. 4B), verificou-se que diferenças significativas ocorreram às 66 e 114 hai. Coerentemente com os dados de  $g_s$ , verificou-se que a relação  $C_i/C_a$  em plantas não supridas com Si apresentou queda até às 66 hai tanto em plantas supridas ou não com Si (Fig. 4C). Embora  $A_{máx}$  decresceu em plantas supridas ou não com Si, diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas às 66, 114 e 138 hai. Às 114 hai,  $A_{máx}$  em plantas supridas com Si foi 143% maior do que o observado para as plantas não supridas com esse elemento. A  $A_{máx}$  correlacionou-se negativamente com a severidade tanto em plantas supridas ou não com Si.

### **Fluorescência da clorofila *a* em plantas supridas ou não com Si e inoculadas com *P. oryzae***

#### **Fluorescência da clorofila *a* no período da manhã**

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi mais elevada em plantas não supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae* em estágios iniciais da infecção (Fig. 5A). Em estágios mais avançados da infecção, essa tendência foi invertida (Fig. 5A). Contudo, apenas às 60 hai houve diferença significativa entre plantas supridas ou não com Si. Não houve correlação significativa entre  $F_0$  e a severidade da brusone em plantas supridas com Si (Tabela 5). Em plantas não supridas com Si, a correlação entre  $F_0$  e a severidade foi negativa e significativa (Tabela 5).

A razão  $F_v/F_m$  decresceu até às 84 hai tanto em plantas supridas ou não com Si. No entanto, após esse período, verificou-se que a razão  $F_v/F_m$  em plantas supridas com Si permaneceu constante ao passo que em plantas não supridas com esse elemento ocorreu uma queda abrupta a partir das 108 hai (Fig. 5B). Em função disso, em estágios finais da infecção, às 108 e 132 hai diferenças significativas foram encontradas ao se comparar plantas supridas e não supridas com Si. Não houve correlação entre a razão  $F_v/F_m$  e severidade em plantas supridas com Si (Tabela 5). Em plantas não supridas com Si houve correlação negativa e significativa entre a razão  $F_v/F_m$  e a severidade (Tabela 6). Não foi verificado correlação significativa entre  $F_v/F_m$  e  $A_{máx}$  em plantas supridas com Si. Tal correlação, no entanto, é significativa para plantas não supridas com Si (Tabela 6). Não houve correlação entre a razão  $F_v'/F_m'$  e a severidade em plantas supridas ou não com Si (Tabelas 5 e 6).

A TTE foi significativamente menor em plantas não supridas com Si às 108 e 132 hai (Fig. 5C). Não houve correlação significativa entre TTE e Sev, independentemente da presença de Si (Tabelas 5 e 6).

Verificou-se que os valores de (QNF) e o ( $q_p$ ) foram menores em plantas não supridas com Si às 108 e 132 hai. Coerentemente verificou-se que às 132 hai, as diferenças entre os valores de QNF e  $q_p$  de plantas supridas e não supridas com Si foram significativas (Fig. 5E e F). Contudo, não houve correlação entre QNF e  $q_p$  com a severidade independentemente da presença de Si (Tabelas 5 e 6).

### **Fluorescência de clorofila *a* no período da tarde**

A  $F_0$  tendeu a ser mais elevada em plantas supridas com Si e inoculadas com *P. grisea* no período da tarde (Fig. 6A). Diferença significativa entre plantas

supridas ou não com Si para  $F_0$  ocorreu apenas às 66 hai (Fig. 6A). Não houve correlação entre  $F_0$  e a severidade em plantas supridas ou não com Si (Tabelas 7 e 8). Houve correlação entre  $A_{máx}$  e  $F_0$  em plantas supridas e não supridas com Si (Tabelas 7 e 8).

A razão  $F_v/F_m$  em plantas supridas com Si apresentou ligeira queda até às 90 hai ao passo que em plantas não supridas com esse elemento ocorreu um ligeiro acréscimo (Fig. 6B). No entanto, após esse período, verificou-se que a razão  $F_v/F_m$  aumentou independente da presença de Si (Fig. 6B). Diferença significativa entre plantas supridas ou não com Si para a razão  $F_v/F_m$  ocorreu às 90 e 144 hai. Não houve correlação entre a razão  $F_v/F_m$  e a severidade tanto em plantas supridas ou não com Si (Tabelas 7 e 8). Houve correlação significativa entre a razão  $F_v/F_m$  e  $A_{máx}$  apenas para as plantas não supridas com Si (Tabela 8).

A TTE foi significativamente menor em plantas não supridas com Si às 66, 90 e 144 hai (Fig. 6C). Houve correlação significativa entre TTE e severidade, em plantas não supridas com Si. Para razão  $F_v'/F_m'$ , houve diferenças significativas entre plantas supridas e não supridas com Si às 66 e 114 hai (Fig. 6D). Quanto ao quenching não fotoquímico (QNF) verificou-se que diferenças significativas às 90 e 144 hai (Fig. 6E) e ao quenching fotoquímico ( $q_p$ ) às 90 e 144 hai (Fig. 6F). Houve correlação significativa entre QNF e severidade em plantas supridas com Si (Tabelas 7 e 8).

### **Concentrações de clorofila *a* e *b* e de carotenóides**

A concentração de clorofila *a* decresceu com o progresso da brusone tanto em plantas supridas ou não com Si (Fig. 7A). Diferenças significativas foram observadas a partir das 108 hai em plantas supridas com Si, nas quais a concentração da clorofila *a* no ultimo período de avaliação foi 44% maior do que em plantas não supridas com esse elemento. A concentração de clorofila *b* decresceu durante o progresso da brusone em plantas não supridas com Si (Fig. 7B). Já nas plantas supridas com Si, a concentração de clorofila *b* foi significativamente superior a partir das 108 hai. Independentemente da presença de Si, a concentração de clorofila total decresceu, porém de forma mais acentuada em plantas não supridas com Si (Fig. 7C). Diferenças significativas foram

observadas a partir das 108 hai em plantas supridas com Si. A concentração de carotenóides decresceu com o progresso da brusone em plantas não supridas com Si (Fig. 7D). Em plantas supridas com Si, a concentração de carotenóides permaneceu estável ao longo das avaliações (Fig. 7D).

## **Discussão**

### **A infecção por brusone afeta os processos fisiológicos de plantas de arroz**

Os principais estudos visando elucidar os efeitos da infecção por *P. oryzae* em plantas de arroz se limitaram a fazer uma avaliação das trocas gasosas em apenas um ponto de todo o processo infeccioso (Burrell & Rees, 1974; Padhi et al., 1978). Este processo, no entanto, é dinâmico e especialmente por *P. oryzae* ser um patógeno hemibiotrófico, os dados obtidos em um dado ponto do processo podem não refletir com exatidão o que ocorre com a planta. Este estudo aqui apresentado é mais abrangente, tanto por abordar os efeitos da brusone nas trocas gasosas ao longo de todo o processo infeccioso permitindo, assim, uma avaliação dinâmica da interação sobre os processos fisiológicos da planta, mas também por agregar a esse estudo a análise de fluorescência de clorofila *a*. Estudos acoplando essas duas técnicas permitem demonstrar que as limitações na fotossíntese em plantas infectadas por patógenos podem ser resultantes tanto de impedimento bioquímico verificado por meio do estudo das trocas gasosas quanto por danos no aparato fotossintético verificado por meio do estudo de fluorescência de clorofila (Alves et al., 2011; Pinkard & Mohammed, 2006). Inúmeros estudos têm focado exclusivamente no efeito do Si sob o desenvolvimento do patógeno, na modificação de componentes de resistência e ou na expressão de genes e atividade de proteínas relacionadas com a defesa da planta (Brunings et al., 2009; Seebold et al., 2001). São escassos os trabalhos avaliando o efeito do Si nos processos fisiológicos de plantas sob infecção de patógenos sejam eles biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos

As avaliações de parâmetros fotossintéticos trocas gasosas e fluorescência de clorofila foram realizadas no período da manhã e no período da tarde, uma vez que há diferenças quanto ao déficit de pressão de vapor e qualidade da luz nesses períodos (Taiz & Zeiger 2004). No entanto, verificou-se que a exceção da

condutância estomática que teve valores reduzidos principalmente no período da tarde em plantas inoculadas com *P. grisea* independentemente do suprimento de Si, os demais parâmetros apresentaram mesma tendência, com pequenas variações aleatórias decorrentes de fatores ambientais não controlados. Esse resultado indica que futuras avaliações do efeito da brusone em outros genótipos de arroz podem ser concentradas em apenas um período. Em função desses resultados, a discussão a seguir apresentada se baseou na tendência apresentada por esses parâmetros e não especificamente em dados coletados em um dos períodos avaliados.

Quando plantas são atacadas por patógenos (principalmente biotróficos e hemibiotróficos), propriedades fisiológicas são afetadas (Alves et al., 2011; Chia & He, 1999; Guo et al., 2005; Swiech et al., 2001). A maioria dos estudos tem relatado que infecções levam a um decréscimo na fotossíntese líquida tanto pela ocorrência de limitação física a entrada e ou deslocamento do CO<sub>2</sub>, quanto por limitações de ordem bioquímica a fixação de CO<sub>2</sub> (Alves et al., 2011; Bastiaans, 1991; Bastiaans & Roumen, 1993; Berger et al., 2007; Chou et al., 2000). Embora tenha sido demonstrado que uma menor  $g_s$  é uma das maiores restrições a fotossíntese em plantas doentes por limitar o influxo de CO<sub>2</sub> para as folhas (Erickson et al., 2004), este não se aplica para o patossistema arroz-*P. grisea* aqui estudado. Embora tenha se verificado uma acentuada queda na  $g_s$  em plantas infectadas por *P. oryzae* como pode ser constatado pela correlação significativa e negativa entre severidade e  $g_s$ , verificou-se também que a relação  $C_i/C_a$  em estágios finais da infecção praticamente não foi alterada. Como limitação ao fluxo de gases parece ter ocorrido, ( $E$ ) foi reduzida proporcionalmente a queda em  $g_s$  e  $A_{máx}$  ter sido muito reduzida em estágios finais da infecção corroborado pelos dados da correlação negativa e significativa entre severidade e  $A_{máx}$ . O fato da relação  $C_i/C_a$  em estágios finais da infecção não ter variado pode indicar que alguma limitação bioquímica a fixação de CO<sub>2</sub> pode ter ocorrido na interação. Caso a queda na  $A_{máx}$  fosse resultante exclusivamente de um menor fluxo de CO<sub>2</sub> e não de um impedimento bioquímico, a relação  $C_i/C_a$  tenderia a ser reduzida à medida que o CO<sub>2</sub> no interior da folha fosse sendo gradativamente fixado. Resultados similares foram encontrados ao se avaliar as trocas gasosas em outros patossistemas envolvendo patógeno hemibiotróficos (Pinkard & Mohammed,

2006) e biotróficos (Alves et al., 2011). É importante ressaltar que, durante o processo fotossintético, o carbono é assimilado por meio de uma série de reações fotoquímicas, enzimáticas e de difusão, sendo cada uma dessas reações altamente influenciadas por fatores internos e externos. O rendimento na assimilação de carbono pela planta pode ser afetado em determinadas situações quando, por exemplo, ocorre redução na atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBP) e, ou mudanças na capacidade de regeneração da RuBP (Bowden et al., 1990; Domiciano et al., 2009; Pinkard & Mohammed, 2006). Neste contexto, é interessante destacar que *P. grisea* é um patógeno hemibiotrófico, e libera várias toxinas não específicas, para aumentar o sucesso de colonização na fase necrotrófica (Aver'yanov et al., 2007). A queda na fotossíntese em fases finais do processo infeccioso pode ser tanto pela ação indireta dessas toxinas em alguns passos da reação de fixação de carbono, quanto da ação direta das mesmas, ao matar as células do hospedeiro induzindo clorose e necrose reduzindo a quantidade de tecido verde e conseqüentemente a fotossíntese. A redução na atividade fotossintética pode ser causada pela redução na interceptação da radiação (RI) (Godoy et al., 2001) resultante da perda de área foliar fotossintetizante e/ou pela diminuição da eficiência de uso da radiação interceptada (RUE), devido à redução da taxa fotossintética do tecido verde remanescente (Johnson, 1987). Assim a redução na concentração de clorofilas e carotenóides em estágios finais da infecção pode ser devido a ação direta de toxinas, assim suas concentrações foliares guardam uma estreita relação com as taxas fotossintéticas e a produtividade primária das culturas (Blackburn, 2007; Streit et al., 2005).

A hipótese de ação indireta de toxinas em passos do ciclo de Calvin é assim reforçada pelos resultados de Bastiaans (1991) que demonstrou que a brusone reduziu a fotossíntese também em tecidos verdes assintomáticos. Ao se observar conjuntamente os dados de severidade,  $g_s$ ,  $A_{máx}$ , concentração de clorofilas e carotenóides verificou-se que a diminuição da taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  é mais afetada que a diminuição da  $g_s$  e do conteúdo de clorofilas, que reflexo do aumento da severidade da doença. Isso reforça a infecção por *P.*

*grisea* nas trocas gasosas não se deve somente a um efeito direto, mas uma combinação de ação direta e indireta.

Tem se demonstrado também que além de limitações bioquímicas, frequentemente ocorrem modificações e, ou danos no aparato fotossintético (Lichtenthaler & Miehe, 1997), que levam a uma menor eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII) (Alves et al., 2011; Baker & Rosenqvist, 2004; Bassanezi et al., 2003; Bonfig et al., 2006; Vankooten et al., 1990), e conseqüentemente a uma menor taxa fotossintética. A avaliação desses efeitos é realizada pela mensuração da fluorescência de clorofila que é um marcador sensível a eficiência da fotossíntese uma vez que a energia dos fótons absorvidos pode ser usada tanto para transporte de elétrons fotossintéticos ou a energia será dissipada como calor ou fluorescência (Vankooten & Snel, 1990). Desse modo, a fluorescência da clorofila responde a mudanças na conversão de energia nos centros de reação do FSII e é também sensível a quaisquer limitações nos passos enzimáticos do complexo da fotossíntese. (Berger et al., 2007).

Neste trabalho foi observado que a infecção por *P. grisea* causou redução na razão  $F_v/F_m$ , que mede a eficiência máxima do FSII pois houve correlação significativa e negativa entre severidade e  $F_v/F_m$ . Como existe ainda correlação significativa e positiva entre  $A_{máx}$  e  $F_v/F_m$  existem portanto, evidências de que a queda na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> se deve além de limitações bioquímicas a limitações na eficiência do FSII. Há de se destacar que essa queda em eficiência do FSII, não esta, associada a uma menor eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII, tendo em vista o fato do parâmetro  $F_v'/F_m'$  não ter sido decrescido com o progresso da doença. Assim, esses dados em conjunto com a pequena variação do parâmetro  $F_0$ , podem indicar ainda que a infecção por *P. grisea* ocasionou uma espécie de fotoinibição crônica da fotossíntese (Krause & Weis, 1991). Esse tipo de reação tem sido verificado em outros patossistemas a exemplo de eucalipto-*Puccinia psidii* (Alves et al., 2011), e no caso do patossistema arroz-*P. grisea*, pode estar associada à ação de toxinas. Tem sido demonstrado que toxinas não seletivas, como ácido tenuazoico, podem inibir o funcionamento do FSII, ao bloquear a cadeia de transporte de elétrons na membrana dos tilacóides (Chen et al., 2007; 2008). Essa hipótese

parece ser bastante plausível tendo em vista que a TTE foi reduzida ao longo de todo o processo infeccioso e em especial em estágios finais da infecção. Em conjunto esses dados podem indicar que a brusone limitou o transporte de elétrons, e conseqüentemente a eficiência do FSII, mas não a captura de energia de excitação o que torna as plantas mais propensas a sofrer com estresse oxidativo, uma vez que a energia fotoquímica absorvida não pode ser totalmente dissipada por meio da fixação de CO<sub>2</sub>, que é usualmente o principal dreno da luz absorvida nos cloroplastos. Para proteger as células, o excesso de energia de excitação deve ser dissipado por meios alternativos, como dissipação térmica (Krause & Weis, 1991; Lima et al., 2002). No entanto, verifica-se por meio dos coeficientes de extinção fotoquímica ( $q_p$ ) e não-fotoquímica (NPQ), que medem a capacidade das plantas de dissipar o excesso de energia de excitação via fotoquímica e via não-fotoquímica, que as plantas sob infecção de *P. grisea* não apenas sofrem de fotoinibição crônica da fotossíntese como também de hiperexcitação crônica, a semelhança daquilo verificado em outros patossistemas (Alves et al., 2011). Desse modo, os centros de reação do FSII devem sofrer um dano fotoinibitório irreversível.

Em síntese, a avaliação do impacto da infecção por *P. oryzae* em plantas de arroz por meio de indicadores não invasivos de características fotossintéticas por meio da mensuração das trocas gasosas e de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* demonstrou que a brusone parece limitar a fotossíntese tanto por meio de impedimento bioquímico quanto por meio de dano ao aparato fotossintético.

### **O suprimento de Si alivia os efeitos da infecção pela brusone nos processos fisiológicos de plantas de arroz**

Recentemente, a constatação da ocorrência de expressão diferencial de 221 genes em plantas supridas com Si em comparação com plantas não supridas, e o fato de dentre esses 28 genes serem relacionados a respostas de defesa a estresses bióticos e abióticos proveu evidências adicionais do papel do Si como modulador da atividade metabólica em plantas de arroz e também como um sinalizador molecular nas vias de transdução de sinais que levam a aumentar resistência do arroz a *P. grisea* (Brunings et al., 2009). É possível que a aplicação de Si seja

assim responsável por pré-condicionar as plantas a reagir a estresses como ressaltado por Brunnings et al., (2009). No entanto, ainda são raros os trabalhos que visam avaliar o efeito do Si nos processos fisiológicos de plantas sob infecção de patógenos, sejam eles biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos (Gao et al., 2011; Mohaghegh et al., 2011). Este trabalho é mais completo até o momento provendo evidências de que o Si tem importante papel em aliviar os efeitos negativos da infecção pela brusone nos processos fisiológicos de plantas de arroz.

Tomando-se por base os parâmetros fisiológicos em plantas supridas com Si a  $g_s$  foi mantida em níveis elevados em estágios finais da infecção, ao passo que em plantas não supridas com esse elemento ocorreu uma queda abrupta nesse parâmetro. Em plantas não supridas com Si, era esperado que com o desenvolvimento da doença, e pela ação de toxinas, que quantidade de tecido verde diminuísse e em consequência a  $g_s$ . Foi demonstrado que as paredes celulares de células localizadas na parte central da lesão tendem a se desintegrar reduzindo assim o transporte de água/assimilados, o que leva ao fechamento estomático (Yoshii, 1937). Além disso, como ocorre morte celular em plantas não supridas com Si, deve ocorrer também diminuição na quantidade de estômatos reduzindo o influxo de  $CO_2$  nessas plantas. Como em plantas supridas com Si ocorre elevada deposição de Si em células da epiderme e do mesófilo (Kim et al., 2002) a doença é mantida em níveis mais baixos, e consequentemente uma menor quantidade de células têm suas paredes celulares desintegradas, o que pode contribuir para manter o fluxo adequado de água, refletindo em uma maior  $g_s$ . Além disso, há de se considerar que por manter uma maior quantidade de tecido verde como evidencia os dados de concentração de clorofilas, que indicam que em plantas supridas com Si ocorre uma menor degradação dessas moléculas podendo ter um maior número de estômatos funcionalmente ativos.

O aumento da  $g_s$  pode estar diretamente relacionado à maior  $E$  em plantas supridas com Si, como demonstram os dados obtidos a partir dos coeficientes de correlação entre essas variáveis, bem como estar diretamente relacionado à maior  $A_{máx}$  em plantas supridas com Si. Embora  $A_{máx}$  tenha decrescido a valores abaixo dos níveis observados em plantas não inoculadas, tanto em plantas supridas com Si, quanto em plantas não supridas com esse elemento, os níveis verificados em

plantas +Si são um pouco mais altas que aqueles verificados em plantas -Si. O efeito atenuante do Si sobre a redução em  $A_{máx}$  pode ser percebido também pela magnitude dos valores de correlação obtidos entre a severidade da doença e  $A_{máx}$ . Os maiores valores de  $A_{máx}$  em plantas supridas com Si podem ser atribuídos a manutenção do tecido verde, manutenção de níveis adequados de fixação de carbono em tecidos assintomáticos. Além disso, a maior concentração de clorofilas e carotenóides pode contribuir para manter a  $A_{máx}$  mais elevada, uma vez que a clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica da fotossíntese (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os pigmentos acessórios, incluindo a clorofila *b*, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (Taiz & Zeiger, 2009). Tem-se demonstrado também que os carotenóides têm efeito protetor nas membranas (Lichtenthaler, 1987), contribuindo assim para a manutenção do fluxo adequado de elétrons nas membranas dos tilacóides. Como, a brusone pode afetar a fixação de CO<sub>2</sub> também em tecidos assintomáticos (Bastiaans, 1991), é provável que o Si mantenha a  $A_{máx}$  mais elevada em função da manutenção de níveis adequados de fixação de carbono em tecidos assintomáticos. É importante destacar, no entanto, que o efeito protetor do Si não é completo. Esse fato é evidenciado tanto pela queda nos valores de  $A_{máx}$  em relação a aqueles de plantas saudáveis, como também pelo fato de, mesmo com uma maior taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ocorrer aumento na relação  $C_i/C_a$  em plantas supridas com Si, que pode ser atribuída também a maior  $g_s$  que permite maior influxo de CO<sub>2</sub> para as células do mesófilo, ou a ocorrência de limitação bioquímica a fixação de CO<sub>2</sub>, mesmo em plantas supridas com Si. Uma vez que *P. grisea* é um patógeno hemibiotrófico que libera toxinas não específicas que podem interferir nas reações de fixação de carbono durante o processo de colonização (Aver'yanov et al., 2007).

Quando se considera os parâmetros de fluorescência de clorofila, assim como para os parâmetros de trocas gasosas, verifica-se que embora estes tenham sido reduzidos com o desenvolvimento da doença, em plantas supridas com Si essa redução foi consideravelmente menor. Isso pode indicar que o Si atua também mitigando os efeitos da brusone sobre o aparato fotossintético. A ( $F_v/F_m$ )

e a (TTE), dois parâmetros que estão diretamente relacionados a fotossíntese (Zhang et al., 2006), são consideravelmente menores em plantas não supridas com Si do que em plantas supridas com esse elemento. Como toxinas, a exemplo do ácido tenuazóico, podem bloquear a cadeia de transporte de elétrons na membrana dos tilacoídes (Chen et al., 2007; 2008), o Si por impedir o pleno desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro, que se dá principalmente na fase biotrófica da interação (Kankanala et al., 2007), pode limitar a quantidade de toxinas produzidas a um nível abaixo do daquele requerido para interromper plenamente o fluxo de elétrons, protegendo assim o FSII. Além disso, o efeito do Si na manutenção do tecido verde pode estar também relacionado ao maior nível desses parâmetros uma vez que a maioria dos cloroplastos podem estar intactos, sem dano. Outro ponto relevante é que a manutenção da eficiência do FSII em níveis mais altos pelo Si pode estar diretamente relacionada ao maior nível de  $A_{máx}$  verificado nessas plantas, juntamente com os fatores anteriormente mencionados.

Um aspecto relevante de plantas supridas com Si é que nessas os coeficientes de quenching não fotoquímico (QNF) e fotoquímico ( $q_p$ ) foram consideravelmente maiores nos estágios finais da infecção. Como demonstrado nesse estudo em plantas não supridas com Si parece ocorrer um estado de hiperexcitação crônica, que pode levar os centros de reação do FSII a sofrerem um dano fotoinibitório irreversível além de estresse oxidativo (o excesso de poder redutor não totalmente dissipado pelas plantas). No caso de plantas supridas com Si, como os valores de QNF e  $q_p$  variaram em torno de seu valor inicial permanecendo em níveis elevados nos estágios finais da infecção, pode-se especular que essas plantas estão menos propensas a entrarem em estado de hiperexcitação crônica do que as plantas não supridas com esse elemento. Além disso, é plausível que o Si esteja atenuando o estresse oxidativo resultante da infecção por *P. grisea*. Assim, existem evidências de que em plantas infectadas por *P. grisea*, o Si tenha um papel importante na manutenção dos níveis adequados de condutância estomática e na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, bem como na proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição crônica e dos fotossistemas contra danos decorrentes da hiperexcitação acentuada.

## Referências

- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1831-1839
- Aver'yanov AA, Lapikova VP, Lebrun MH (2007) Tenuazonic acid, toxin of rice blast fungus, induces disease resistance and reactive oxygen production in plants. *Russ J Plant Physl* 54: 749-754
- Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55: 1607-1621
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamim Filho A, Berger RD (2003) Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *J Phytopathol* 150: 37-47
- Bassanezi RB, Martins MC, Godoy CV, Amorim L, Bergamim Filho A (1997) Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 22: 520-524
- Bastiaans L (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* 81: 611-615
- Bastiaans L, Roumen EC (1993) Effect on leaf photosynthetic rate by leaf blast for rice cultivars with different types and levels of resistance. *Euphytica* 66: 81-87
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* 58: 4019-4026
- Blackburn GA (2007) Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *J Exp Bot* 58: 855-867

- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berge S (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*: 1-12
- Bowden RL, Rouse DI, Sharkey TD (1990) Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Physiol* 94: 1048-1055
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol* 155: 161-170
- Burrell MM, Rees T (1974) Carbohydrate metabolism of rice leaves infected by *Pyricularia-Oryzae*. *Physiol Plant Pathol* 4: 489-496
- Chen SG, Xu XM, Dai XB, Yang CL, Qiang S (2007) Identification of tenuazonic acid as a novel type of natural photosystem II inhibitor binding in Q(B)-site of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioenergetics* 1767: 306-318
- Chen SG, Yin CY, Dai XB, Qiang S, Xu XM (2008) Action of tenuazonic acid, a natural phytotoxin, on photosystem II of spinach. *Environ Exp Bot* 62: 279-289
- Chia TF, He J (1999) Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plants after virus eradication. *Experimental Botany* 42: 11-16
- Chou H, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* 1: 99-113
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW (2007) Silicon and plant disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St Paul, MN, USA, pp 233-246
- Domiciano GP, Resende RS, Rodrigues FA, DaMatta FM (2009) Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 17: 305-339
- Erickson JE, Stanosz GR, Kruger EL (2004) Photosynthetic consequences of Marssonina leaf spot differ between two poplar hybrids. *New Phytol* 161: 577-583
- Fauteux F, Remus-Borel W, Menzies JG, Belanger RR (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *Fems Microbiol Lett* 249: 1-6

- Gao D, Cai KZ, Chen JN, Luo SM, Zeng RS, Yang JY, Zhu XY (2011) Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 675-682
- Godoy CV, Amorim L, Bergamim Filho A (2001) Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*. *Fitopatologia Brasileira* 26: 209-215
- Goodwin PH (1992) Effect of common bacterial blight on leaf photosynthesis of bean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 203-206
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Chen JS, Rao GZ (2005) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Sci* 168: 57-63
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32
- IRRI I (ed) (1996) *Standard Evaluation System for Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines
- Jia YL, Wang ZH, Fjellstrom RG, Moldenhauer KAK, Azam MA, Correll J, Lee FN, Xia YW, Rutger JN (2004) Rice *Pi-ta* gene confers resistance to the major pathotypes of the rice blast fungus in the United States. *Phytopathology* 94: 296-301
- Johnson KB (1987) Defoliation, Disease, and Growth - a Reply. *Phytopathology* 77: 1495-1497
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* 19: 706-724
- Kawasaki S (ed) (2004) *Proceedings of the 3rd International Rice Blast Conference*. Rice Blast: Interaction with Rice and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Kim SG, Kim KW, Park EW, Choi D (2002) Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: A possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology* 92: 1095-1103

- Korndörfer GH, Pereira HS, Nola A (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Boletim Técnico 1, Grupo de Pesquisa em Silício ICIAG-Universidade Federal de Uberlândia: 28
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 313-349
- Liang YC, Sun WC, Zhu YG, Christie P (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environ Pollut* 147: 422-428
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and Carotenoids - Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382
- Lichtenthaler HK, Miehe JA (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-320
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff LE, Korndörfer GH, Snyder GH (eds) *Silicon in agriculture*. Elsevier Science, The Netherlands, pp 17-39
- Ma JF, Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci* 11: 392-397
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh AH, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N (2011) Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Dis* 95: 455-460
- Ohashi Y, Kuroda K, Sasaki K, Iwai T, Yazaki Y, Hiraga S, Seo S, Mitsuhara I, Minami E (2006) Rapid defense gene expression in both resistant and susceptible rice cultivars by elicitor(s) originating from conidia of blast fungus - Basal resistance response before fungal penetration into host cells. *Physiol Mol Plant P* 69: 13-25
- Padhi B, Chakrabarti NK, Nayak SK (1978) Effect of blast infection on photosynthetic activity of rice seedlings. *Biol Plantarum* 20: 418-420

- Pinkard EA, Mohammed CL (2006) Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with Mycosphaerella leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-127
- Rabbinge R, Jorritsma ITM, Schans J (1985) Damage components of powdery mildew in winter wheat. *Neth J Plant Pathol* 91: 235-247
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93: 535-546
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2004a) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 94: S146-S147
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant P* 66: 144-159
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N, Menzies JG, Belanger RR (2004b) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94: 177-183
- Rodrigues FA, Rollins JA, Datnoff LE, Jurick WM, Jones JB (2004c) Cytological and molecular aspects of silicon-mediated resistance to rice blast. *Phytopathology* 94: S88-S88
- Seebold KW, Kucharek TA, Datnoff LE, Correa-Victoria FJ, Marchetti MA (2001) The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91: 63-69
- Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- Shtienberg D (1992) Effects of foliar disease on gas exchange process: a comparative study. *Phytopathology* 82: 760-765
- Spitters CJT, Vanroermund HJW, Vannassau HGMG, Schepers J, Mesdag J (1990) Genetic variation in partial resistance to leaf rust in winter wheat disease progress, foliage senescence and yield reduction. *Neth J Plant Pathol* 96: 3-15

- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system).  
<http://www.statsoft.com>
- Streit MN, Canterle LP, Canto MW, Hecktheuer LHR (2005) Clorofila: uma revisão. *Ciência Rural* 35: 748-755
- Swiech R, Browning S, Molsen D, Stenger DC, Holbrook GP (2001) Photosynthetic responses of sugar beet and *Nicotiana benthamiana* Domin. infected with beet curly top virus. *Physiol Mol Plant P* 58: 43-52
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Plant Physiology*. Sinauer Associates
- Talbot NJ (2003) On the trail of a cereal killer. *Annu. Rev. Microbiol* 57: 177-202
- van Oijen M (1990) Photosynthesis is not impaired in healthy tissue of blighted potato plants. *Neth J Plant Pathol* 96: 55-63
- Vankooten O, Meurs C, Vanloon LC (1990) Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with Tobacco Mosaic-Virus. *Physiol Plantarum* 80: 446-452
- Vankooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25: 147-150
- Yoshida SS, Ohnishi Y, Kitagishi K (1962) Chemical forms, mobility, and deposition of silicon in rice plant. *Soil Sci Plant Nutr* 8: 15-21
- Yoshii H (1937) Pathological studies of rice blast caused by *Pyricularia oryzae*. III Pathohistological observations of diseased plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 7: 289-304
- Zhang CJ, Chen GX, Gao XX, Chu CJ (2006) Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. *South African Journal of Science* 72: 15-23

**Tabela 1.** Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) e severidade (Sev) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Período das 7 às 10 horas.

Parâmetros	$A_{máx}$	$g_s$	$E$	$C_i/C_a$	Sev
$A_{máx}$		0,16	0,74	-0,55	-0,59
$g_s$	0,40 <sup>ns</sup>		0,55	0,58	0,29
$E$	0,0001*	0,0001*		-0,14	-0,17
$C_i/C_a$	0,0001*	0,0001*	0,47		0,68
Sev	0,0001*	0,12 <sup>ns</sup>	0,38	0,0001*	

\* = significativo e ns não significativo

**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) e severidade (Sev) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva não contendo silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Período das 7 às 10 horas.

Parâmetros	$A_{máx}$	$g_s$	$E$	$C_i/C_a$	Sev
$A_{máx}$		0,77	0,84	-0,56	-0,84
$g_s$	0,0001*		0,77	-0,03	-0,47
$E$	0,0001*	0,0001*		-0,31	-0,58
$C_i/C_a$	0,0001*	0,89 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>		0,67
Sev	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	

\* = significativo ns= não significativo

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) e severidade (Sev) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Período das 12 às 14 horas.

Parâmetros	$A_{máx}$	$g_s$	$E$	$C_i/C_a$	Sev
$A_{máx}$		0,76	0,81	-0,20	-0,35
$g_s$	0,0001*		0,88	0,41	-0,47
$E$	0,0001*	0,0001*		0,17	-0,38
$C_i/C_a$	0,30 <sup>ns</sup>	0,02*	0,38 <sup>ns</sup>		-0,24
Sev	0,06 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,04*	0,2 <sup>ns</sup>	

\* = significativo ns= não significativo

**Tabela 4.** Coeficientes de correlação de Pearson para os parâmetros, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) e severidade ( $Sev$ ) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva não contendo silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Período das 12 às 14 horas.

Váriavéis	$A_{máx}$	$g_s$	$E$	$C_i/C_a$	$Sev$
$A_{máx}$		0,82	0,86	-0,20	-0,84
$g_s$	0,0001*		0,93	0,31	-0,62
$E$	0,0001*	0,0001*		0,17	-0,75
$C_i/C_a$	0,3 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>ns</sup>		0,25
$Sev$	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,19 <sup>ns</sup>	

\* = significativo ns= não significativo

**Tabela 5.** Coeficientes de correlação de Pearson entre severidade (Sev), fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (TTE), eficiência de captura da energia de excitação pelo centros de reação abertos do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ), - coeficientes de quenching fotoquímico e não fotoquímico  $q_p$  e QNF, taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A_{máx}$ ) em plantas de arroz supridas com silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae* no período entre 7:00 e 10:00 horas.

Variáveis	Sev	$F_0$	$F_v/F_m$	TTE	QNF	$q_p$	$F_v'/F_m'$	$A_{máx}$
Sev		0,05	0,02	0,24	0,14	0,25	-0,11	-0,60
$F_0$	0,81 <sup>ns</sup>		-0,26	-0,04	-0,05	-0,02	-0,22	-0,23
$F_v/F_m$	0,92 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>		0,03	0,51	-0,02	0,46	0,03
TTE	0,20 <sup>ns</sup>	0,84 <sup>ns</sup>	0,89 <sup>ns</sup>		0,08	0,99	-0,04	0,19
QNF	0,47 <sup>ns</sup>	0,80 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,67 <sup>ns</sup>		0,13	-0,53	0,0001
$q_p$	0,18 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>ns</sup>	0,001*	0,48 <sup>ns</sup>		-0,14	0,19
$F_v'/F_m'$	0,56 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	0,01*	0,82 <sup>ns</sup>	0,001*	0,46 <sup>ns</sup>		0,04
$A_{máx}$	0,001*	0,22 <sup>ns</sup>	0,86 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	1	0,32 <sup>ns</sup>	0,84 <sup>ns</sup>	

\* = significativo ns= não significativo

**Tabela 6.** Coeficiente de correlação de Pearson, e seus respectivos valores de probabilidades, entre severidade (Sev), fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (TTE), eficiência de captura da energia de excitação pelo centros de reação abertos do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ), - coeficientes de quenching fotoquímico e não fotoquímico  $q_p$  e QNF, taxa de assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A_{máx}$ ) mensuradas em plantas de arroz não supridas com silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Avaliações ocorreram entre 7:00 e 10:00.

Parâmetros	Sev	$F_0$	$F_v/F_m$	TTE	QNF	$q_p$	$F_v'/F_m'$	$A_{máx}$
Sev		-0,44	-0,57	-0,29	-0,34	-0,30	-0,04	-0,84
$F_0$	0,01*		0,32	0,04	0,29	0,09	-0,20	0,41
$F_v/F_m$	0,0001*	0,08 <sup>ns</sup>		-0,01	0,77	0,06	-0,31	0,57
TTE	0,12 <sup>ns</sup>	0,83 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>		-0,12	0,99	0,27	0,38
QNF	0,07 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,54 <sup>ns</sup>		0,03	-0,84	0,33
$q_p$	0,11 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>	0,75 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,88 <sup>ns</sup>		0,11	0,41
$F_v'/F_m'$	0,85 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,56 <sup>ns</sup>		0,01
$A_{máx}$	0,0001*	0,02*	0,0001*	0,04*	0,08 <sup>ns</sup>	0,03*	0,94 <sup>ns</sup>	

\* = significativo ns= não significativo

**Tabela 7.** Coeficiente de correlação de Pearson, e seus respectivos valores de probabilidades, entre severidade (Sev), fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (TTE), eficiência de captura da energia de excitação pelo centros de reação abertos do FSII, ( $F_v'/F_m'$ ) - coeficientes de quenching fotoquímico e não fotoquímico  $q_p$  e QNF, taxa de assimilação líquida de  $CO_2$   $A_{máx}$  mensuradas em plantas de arroz supridas com silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Avaliações ocorreram entre 12:00 e 14:00.

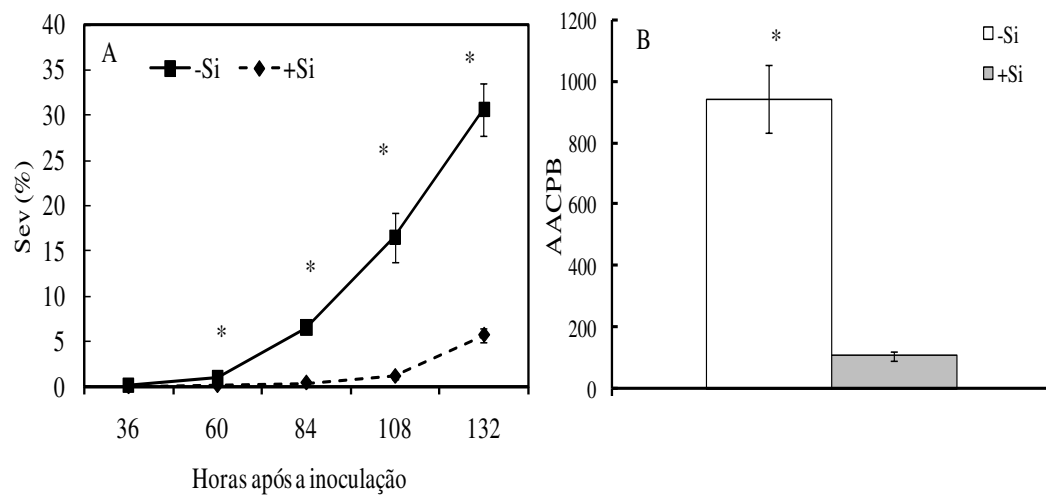
Parâmetros	Sev	$F_0$	$F_v/F_m$	TTE	QNF	$q_p$	$F_v'/F_m'$	$A_{máx}$
Sev		0,11	-0,48	0,23	-0,41	0,17	0,30	-0,36
$F_0$	0,54 <sup>ns</sup>		-0,88	-0,02	-0,02	0,26	-0,59	-0,66
$F_v/F_m$	0,80 <sup>ns</sup>	0,001*		0,08	0,01	-0,21	0,65	0,67
TTE	0,23 <sup>ns</sup>	0,93 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>ns</sup>		-0,58	0,91	0,58	-0,17
QNF	0,03*	0,94 <sup>ns</sup>	0,98 <sup>ns</sup>	0,001*		-0,34	-0,74	0,24
$q_p$	0,36 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	0,001*	0,07 <sup>ns</sup>		0,22	-0,33
$F_v'/F_m'$	0,11 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,001*	0,001*	0,0001*	0,25 <sup>ns</sup>		0,24
$A_{máx}$	0,06 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,001*	0,37 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	1

\* = significativo ns= não significativo

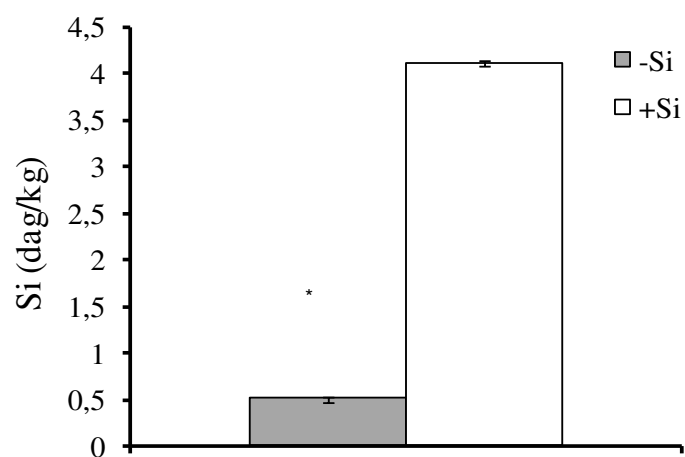
**Tabela 8.** Coeficiente de correlação de Pearson, e seus respectivos valores de probabilidades, entre severidade (Sev), fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (TTE), eficiência de captura da energia de excitação pelo centros de reação abertos do FSII ( $F_v'/F_m'$ ), - coeficientes de quenching fotoquímico e não fotoquímico  $q_p$  e QNF, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{máx}$ ) mensuradas em plantas de arroz não supridas com silício e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Avaliações ocorreram entre 12:00 e 14:00.

Parâmetros	Sev	$F_0$	$F_v/F_m$	TTE	QNF	$q_p$	$F_v'/F_m'$	$A_{máx}$
Sev		-0,03	-0,19	-0,40	0,20	-0,69	-0,32	-0,84
$F_0$	0,88 <sup>ns</sup>		-0,68	0,06	0,02	0,29	-0,61	-0,15
$F_v/F_m$	0,33 <sup>ns</sup>	0,0001*		-0,06	0,28	-0,31	0,57	0,30
TTE	0,03*	0,76 <sup>ns</sup>	0,74 <sup>ns</sup>		-0,73	0,94	0,60	0,29
QNF	0,28 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,0001*		-0,62	-0,62	-0,15
$q_p$	0,03*	0,12 <sup>ns</sup>	0,1 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,0001*		0,30	0,23
$F_v'/F_m'$	0,08 <sup>ns</sup>	0,0001*	0,001*	0,0001*	0,0001*	0,001*		0,39
$A_{máx}$	0,0001*	0,41 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	0,04*	

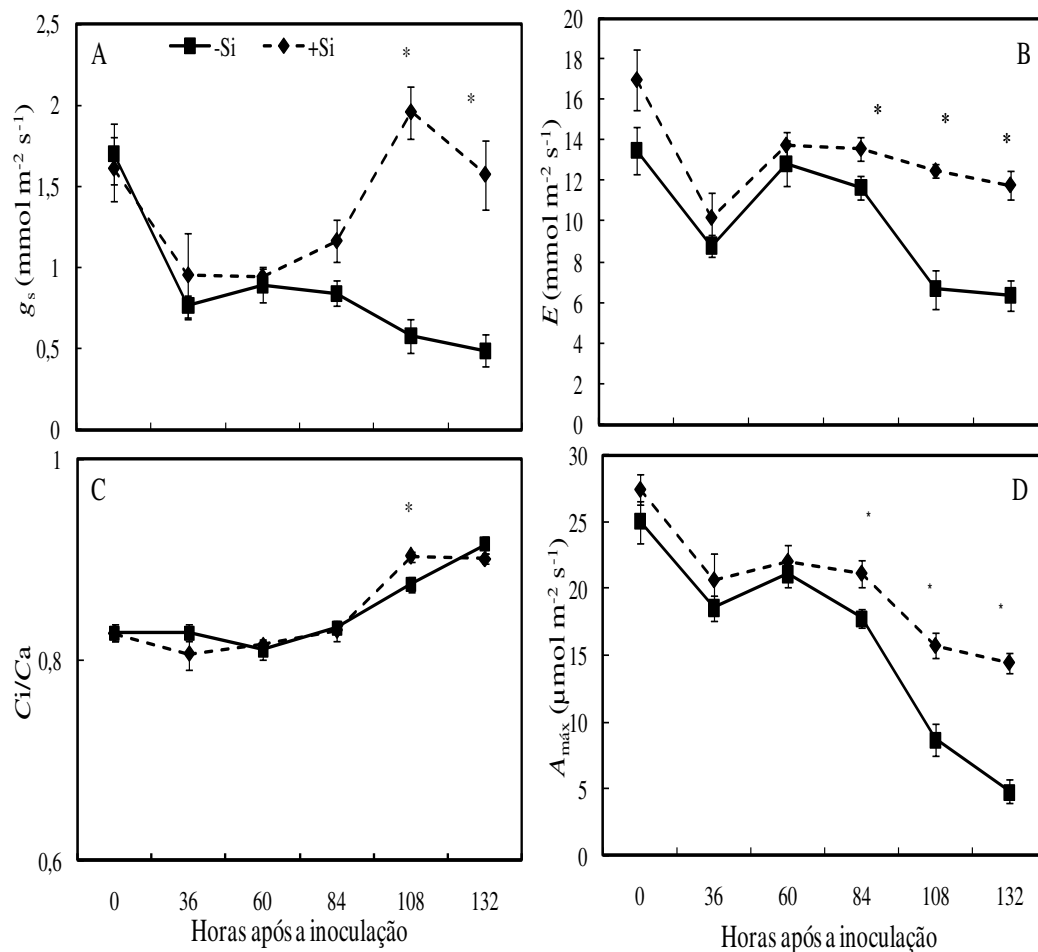
\* = significativo ns= não significativo



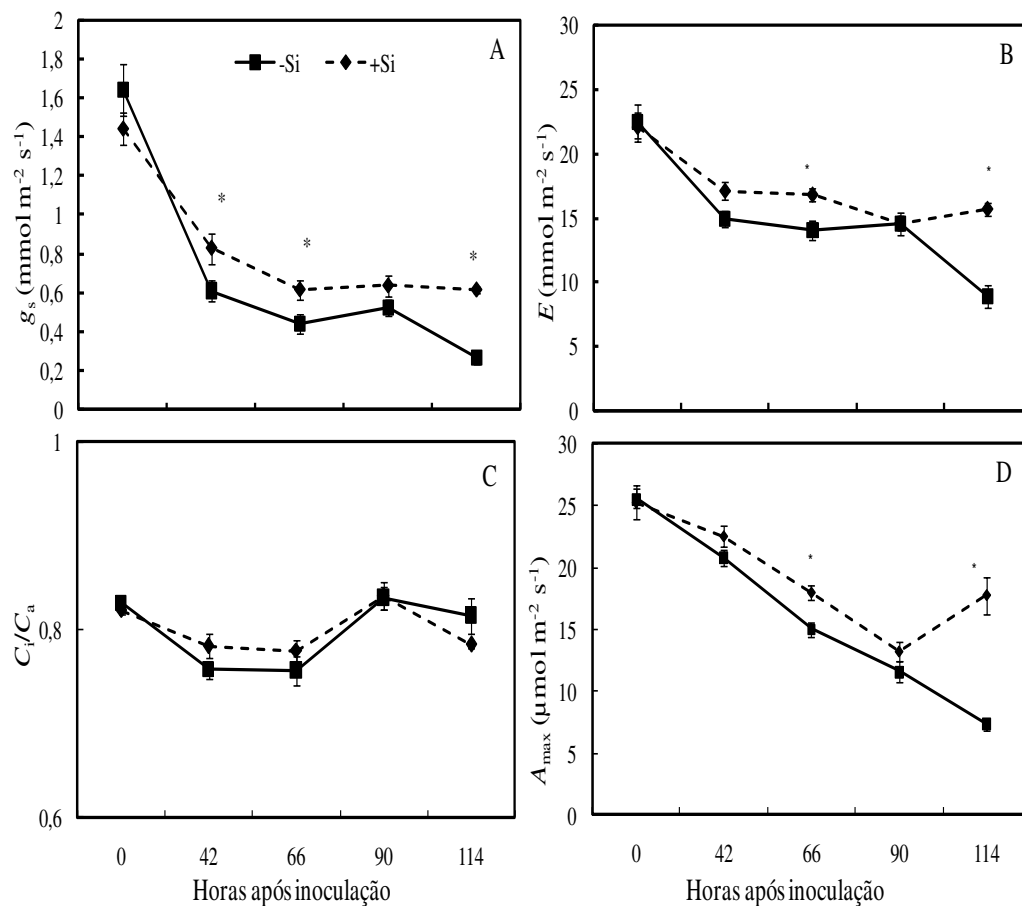
**Fig 1.** Curvas de progresso da brusone (A) e área abaixo da curva de progresso da brusone (AACPB) (B) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si). Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo test *t* ao nível de 5% de probabilidade. Em A, cada ponto representa a média de seis repetições. Em B,  $n = 30$  para cada tratamento.



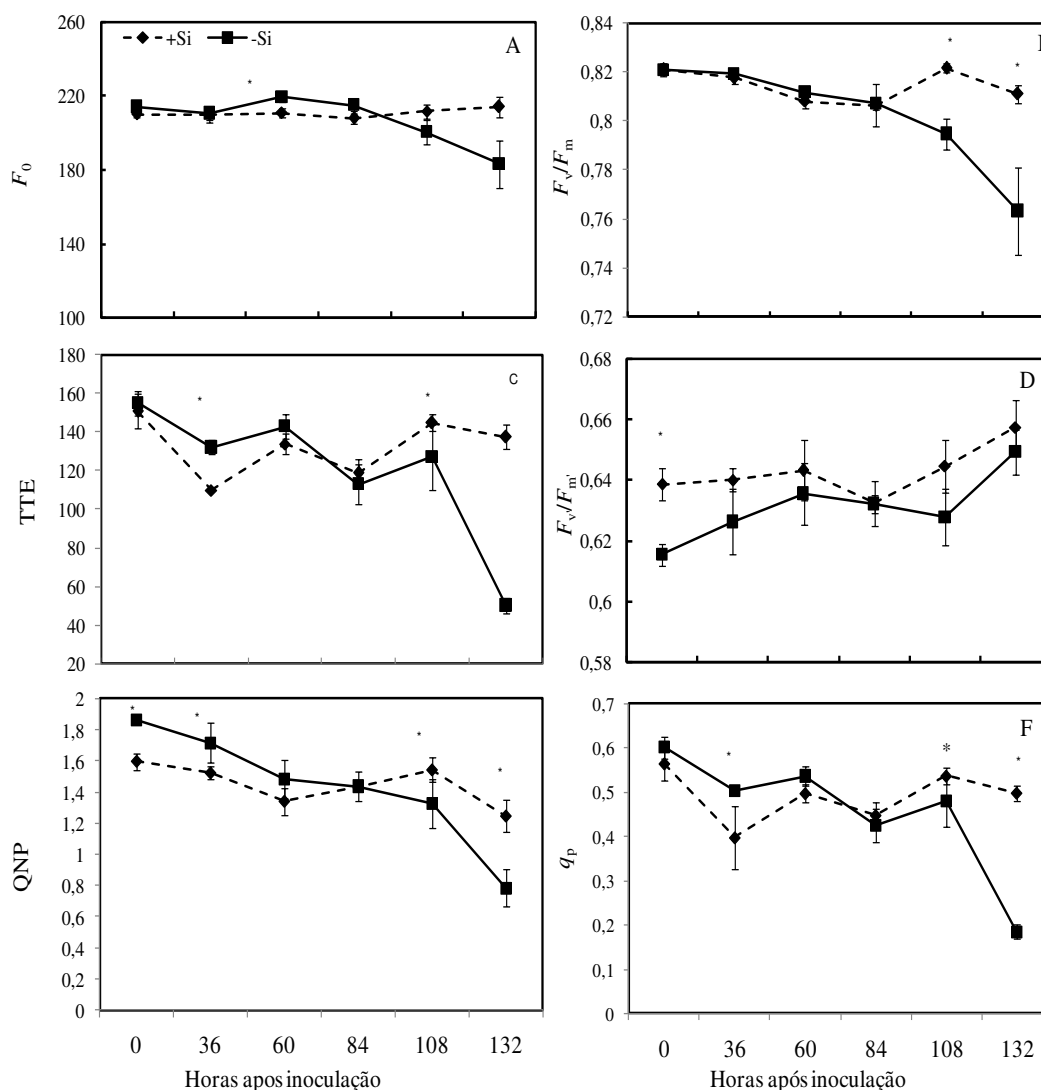
**Fig 2.** Concentração foliar de silício (Si) em plantas supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com Si. As barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.



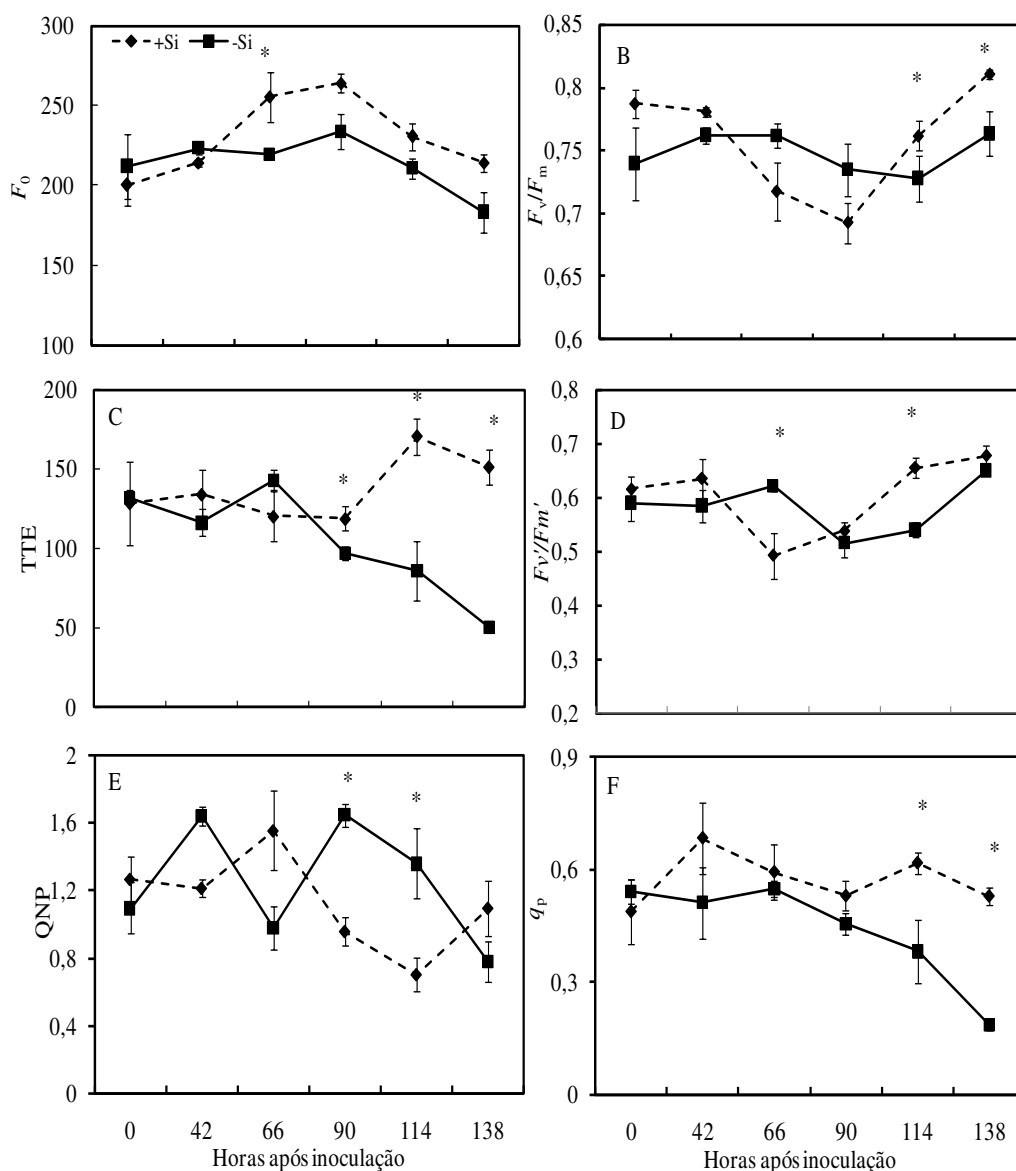
**Fig 3.** Condutância estomática ( $g_s$ ) (A), transpiração ( $E$ ) (B), razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) (C) e taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{máx}}$ ) (D) obtidas durante o período da manhã (7:00 - 10:00 horas) em plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ao nível de 5% de probabilidade.



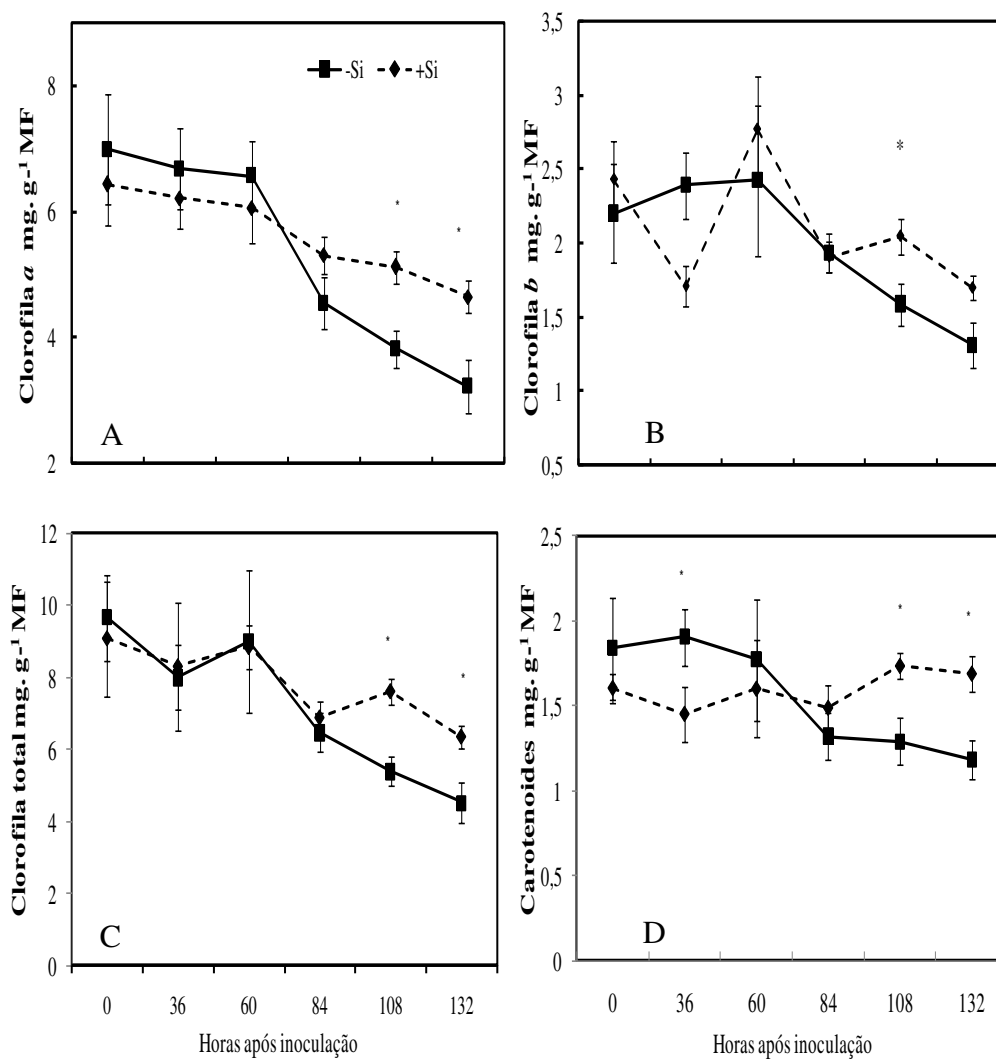
**Fig 4.** Condutância estomática ( $g_s$ ) (A), transpiração ( $E$ ) (B), razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) (C) e taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{m\acute{a}x}$ ) (D) obtidas durante o período da tarde (12:00 - 14:00 horas) em plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos - Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste  $t$  ao nível de 5% de probabilidade.



**Fig 5.** Fluorescência inicial ( $F_0$ ) (A), eficiência máxima do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) (B), taxa de transporte de elétrons (TTE) (C), eficiência máxima de captura do fotossistema II (D) quenching não fotoquímico (QNP) (E) quenching fotoquímico  $q_p$  (F) obtidas no período da manhã (7:00-10:00) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas com silício (-Si) e inoculadas com *Pyricularia grisea*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.



**Fig 6.** Fluorescência inicial ( $F_0$ ) (A), eficiência máxima do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) (B), taxa de transporte de elétrons (TTE) (C), eficiência máxima de captura do fotossistema II (D) quenching não fotoquímico (QNP) (E) quenching fotoquímico  $q_p$  (F) obtidas no período da tarde (12:00-14:00) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas com silício (-Si) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.



**Fig 7.** Concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e de carotenóides (D) em plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas com silício (-Si) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE ARROZ INDUZIDOS PELA INFECTADAS POR *Pyricularia oryzae* E SUPRIDAS COM SILÍCIO**

**Resumo** - Plantas de arroz sob infecção de brusone pode estarem mais propensas a sofrer com o estresse oxidativo como desequilíbrio entre a produção e a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e o fato do Si controlar eficientemente a doença, nós avaliamos o efeito da infecção por *P. grisea* na atividade de componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema antioxidante ao longo de todo o processo infeccioso e o efeito da aplicação do Si nesses mesmos parâmetros em plantas inoculadas. Nossos resultados indicam que a brusone induziu a ocorrência de estresse oxidativo como forma de acelerar a morte celular e que esta indução ocorre por meio de inibição da fotossíntese, por meio da indução da ação SOD e limitação na atividade de catalases e de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa impedindo assim a detoxificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado o Si parece aliviar o estresse oxidativo induzido pela brusone regulando o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio de repressão a ação SOD e estimulando a atividade de catalases e de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa.

## Introdução

O efeito do silício (Si) na interação arroz-*Pyricularia grisea* têm sido estudado do ponto de vista da potencialização de mecanismos de defesa em resposta a infecção pelo patógeno (Datnoff et al., 2007; Ebolle, 2007). Existem evidências de que o Si alivia as alterações no metabolismo das plantas, condicionando-as a tolerar estresses de natureza biótica e ou abiótica (Brunings et al., 2009; Fauteux et al., 2005; Rodrigues et al., 2003a; 2003b; 2004a; 2004b; 2005).

Plantas sob estresses de origem biótica e ou abiótica (ex. déficit hídrico e alagamento) produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e no apoplasto (Mittler, 2002). Os efeitos do estresse oxidativo são variáveis, pois alterações pequenas no equilíbrio redox são rapidamente eliminadas enquanto que alterações de maior escala podem levar à morte celular devido a produção de peróxidos e radicais livres que danificam a maioria dos componentes celulares, incluindo proteínas, pigmentos fotossintéticos e ácidos nucleicos (Foyer et al., 1994). As EROs podem causar, ainda, a peroxidação dos lipídios, o que acaba por alterar a permeabilidade das membranas celulares e, conseqüentemente, a homeostase celular (Liang et al., 2003; Mittler, 2002). No caso de plantas infectadas por patógenos, as EROs têm também papel relevante nos mecanismos de defesa, pois além do efeito antimicrobiano, podem também estimular, via sinalização redox, outros mecanismos de defesa como a reação de hipersensibilidade em plantas exibindo resistência vertical, além da produção de lignina e de fitoalexinas (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997). Assim, no contexto das interações planta-patógeno, as EROs devem ser continuamente mantidas em concentrações adequadas para desempenharem seu papel protetor sem, no entanto, comprometer a integridade celular (Foyer et al., 1994; Resende et al., 2003). A remoção e ou detoxificação das EROs é realizada por um complexo pelo sistema antioxidativo responsável pela manutenção e balanço das EROs nas células das plantas. Esse sistema tem tanto componentes enzimáticos ou não enzimáticos (Foyer et al., 1994). No que concerne os componentes enzimáticos, a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da

glutathiona (GR) são as principais enzimas envolvidas na detoxificação das EROs, ao passo que a glutathiona e o ácido ascórbico são os principais metabólitos não enzimáticos envolvidos na detoxificação das EROs (Yan et al., 1996).

Sun et al. (2010) observaram que plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *P. grisea* apresentaram aumento na atividade das enzimas CAT e lipoxigenases (LOX) e menor concentração de aldeído malônico (MDA), o qual é um indicativo da peroxidação dos lipídeos. Segundo esses mesmos autores, plantas de arroz responderam ao suprimento de Si com um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e na peroxidação de lipídios, sendo tais respostas associadas com a ativação de mecanismos de defesa do arroz. No patossistema pepino-*Phytophthora melonis*, foi demonstrado que em plantas inoculadas com o patógeno e supridas com Si, houve decréscimo na permeabilidade das membranas celulares e uma redução da peroxidação dos lipídios nas raízes ao contrário do observado para plantas não inoculadas e não supridas com esse elemento (Mohaghegh et al., 2011). Além disso, verificou-se que o Si houve aumento na atividade das enzimas CAT e SOD (Mohaghegh et al., 2011). O papel do Si em atenuar condições de estresse abiótico, a exemplo de salinidade e toxicidade do boro também tem sido investigado (Gunes et al., 2007). Nesses casos, demonstrou-se que o Si contribuiu para a manutenção de muitas das funções fisiológicas e bioquímicas das plantas tais como a atividade da LOX e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX aliviando, assim, o estresse oxidativo das plantas.

Tendo em vista a escassez de estudos visando elucidar os impactos da brusone na fisiologia de plantas de arroz e o papel do Si no metabolismo do sistema antioxidante, esse trabalho objetivou verificar o efeito desse elemento nos componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema antioxidante em plantas de arroz infectadas ou não por *P. grisea*.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal**

Sementes de arroz (cv. Metica-1) foram submetidas à desinfestação superficial com uma solução de 10% vol de NaOCl por 3 min. Em seguida, as

sementes foram lavadas em água estéril e semeadas em bandejas contendo areia. Aos 5 dias após germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 litros de solução nutritiva a 1/2 força iônica. A solução nutritiva foi baseada naquela desenvolvida por Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e incluíram os macronutrientes: 1 M/L KNO<sub>3</sub>, 0,25 M/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M/L NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 M/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, e 1,0 M/L Ca<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>).4H<sub>2</sub>O e os seguintes micronutrientes: 0,30 mM/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,33 mM/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 11,5 mM/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,5 mM/L MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,1 mM/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 25 mM/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 25 mM/L EDTA Bisódico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total, adicionando-se ou não o ácido monosilícico. O ácido monosilícico, usado como fonte de Si, foi preparado passando o silicato de potássio em resina de troca catiônica (Amberlite IR-120B, H<sup>+</sup> forma; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2001). As doses de Si usadas foram 0 ou 2 mM/L. A solução nutritiva, sem aeração, foi trocada a cada quatro dias e o pH verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0 usando HCl ou NaOH M quando necessário.

### **Inoculação das plantas e avaliação da severidade da brusone**

As plantas de arroz foram inoculadas aos 45 dias após o transplântio para solução nutritiva com um isolado monospórico de *P. oryzae* (CNPAF-1048) cedido pela EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás. O isolado foi preservado em papel filtro e armazenado em freezer a -20°C. Pedacos de papel filtro contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Após 10 dias, discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio de aveia e armazenadas a 25°C por 15 dias. Após esse período, as placas contendo o micélio do fungo foram submetidas à raspagem superficial e deixadas abertas expostas a luz continua por 3 dias para a produção de conídios. A suspensão de conídios foi obtida pela adição de, aproximadamente, 10 ml de água destilada com 1% (p/v) de gelatina, em cada placa, seguido de raspagem superficial com um pincel de cerdas macias. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em gaze para remoção de micélio e fragmentos de BDA. Em seguida, a concentração da

suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^5$  conídios/ml em hemacitômetro. Foi adicionado Tween 80 (0,1/100 ml) de suspensão para reduzir a tensão superficial na superfície foliar. A inoculação das plantas foi realizada com aerógrafo pressurizado (Paasche Airbrusch Co., Chicago, EUA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade relativa de  $90 \pm 5\%$ , temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro onde permaneceram até o final das avaliações.

A severidade da brusone foi avaliada às 36, 60, 84, 108 e 132 horas após inoculação (hai) utilizando-se a escala proposta pelo “International Rice Research Institute” (IRRI, 1996). Os dados obtidos foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB) por meio de integração trapezoidal (Shaner & Finney, 1977).

#### **Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de aldeído malônico (MDA) e da atividade da lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12)**

A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada segundo metodologia proposta por Lee & Lee (2000). Os danos celulares indicando a ocorrência de estresse oxidativos por meio da peroxidação de lipídios foram mensurados via acúmulo de MDA de acordo com Cakmak & Horst (1991). Para a determinação da atividade da LOX, amostras da terceira e quarta folhas completamente expandidas do perfilho principal das plantas das repetições de cada tratamento foram trituradas em almofariz gelado contendo 60 mg de polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) e 2 ml de tampão de extração fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). A mistura resultante foi centrifugada por 20 min a  $16000 \times g$  a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e atividade da LOX foi quantificada utilizando-se o ácido linoléico como substrato. Cada 1 ml de reação continha 850  $\mu\text{l}$  do tampão de reação fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), 100  $\mu\text{L}$  da solução do substrato linoleato de sódio e 50  $\mu\text{l}$  do extrato vegetal. A atividade da LOX foi mensurada pelo aumento na absorbância em um ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 234 nm durante um período de 2 min a intervalos de 30 seg. A atividade da LOX foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção

molar de  $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Axelrod et al., 1981). A concentração de proteína em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

**Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e redutase da glutatona (GR; EC 1.8.1.7)**

Para determinar a atividade da SOD (Giannopolitis & Ries, 1977; Lima et al., 2002), CAT (Havir & Mchale, 1987; Lima et al., 2002), APX (Lima et al., 2002; Nakano & Asada, 1981) e GR (Foyer & Halliwell, 1976), amostras da terceira e quarta folhas completamente expandidas do perfilho principal de plantas das repetições de cada tratamento foram trituradas utilizando almofariz gelado contendo 60 mg de PVPP e 1 ml de tampões de extração específicos para cada enzima a saber: SOD (100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,8), 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) e 0,1% Triton X-100), CAT (100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) e 0,1 mM EDTA), APX (50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) e 1 mM ascorbato) e GR (tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 50 mM EDTA, 10 mM isoascorbato, 9 mM 2-mercaptoetanol, 3 mM dithiothreitol (DTT) e 0,1% (v/v) Triton X-100. As misturas resultantes foram centrifugadas por 15 min a  $15000 \times g$  na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi coletado e utilizado nas avaliações das atividades enzimáticas e concentração de proteínas (Bradford, 1976).

A atividade da SOD foi determinada medindo a capacidade dessa enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de p-nitrotetrazólio (NBT) de acordo com metodologia de Giannopolitis & Ries (1977). Cada 2 ml do extrato de reação foi composto de 50 mM do tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 14 mM metionina, 75  $\mu\text{M}$  NBT, 0,1  $\mu\text{M}$  EDTA, 5  $\mu\text{l}$  do extrato enzimático e 2  $\mu\text{M}$  de riboflavina. A produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT, foi monitorada pelo incremento na absorbância a 560 nm como descrito em Martinez et al. (2011). Uma unidade de SOD foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT. A atividade da CAT foi estimada pela taxa de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm (Havir & Mchale, 1987). Cada 2 ml do extrato de reação foi composto por 50 mM do tampão fosfato de

potássio (pH 7,0), 12,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 µl do extrato enzimático. Uma unidade da CAT foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para decompor 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. A atividade da APX foi determinada monitorando o declínio na absorvância no comprimento de onda 290 nm a segundo Nakano & Asada (1981). Cada 2 ml do extrato de reação foi composto por 50 mM do tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 µl do extrato enzimático. Uma unidade da APX foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 µmol de ascorbato min<sup>-1</sup>. A atividade da GR foi avaliada por meio da taxa de oxidação de NADPH e NADH, a 340nm. O extrato de reação foi composto de 50 mM do tampão Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM glutatona reduzida GSH, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,15 mM NADPH.

### **Determinação da concentração foliar de Si**

Parte das folhas da terceira e quarta follhas completamente expandidas do perfilho principal das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água deionizada, secas em estufa por um período de 72 horas a 65°C e, posteriormente, trituradas em moinho tipo Thomas-Wiley. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica (Korndörfer et al., 2004).

### **Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos consistiam em duas doses de Si (0 e 2 mM/l) com seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas. As médias dos tratamentos -Si e +Si para atividade das enzimas do sistema antioxidante e para a concentração foliar de Si foram comparadas pelo teste-*t* ao nível de 5% de probabilidade usando o software STATISTICA (StatSoft, 2004).

## **Resultados**

### **Progresso da brusone, AACPB e concentração foliar de Si:**

A severidade da brusone foi reduzida pelo suprimento de Si durante todo o período avaliado (Fig. 1A). Em plantas de arroz não supridas com Si, a severidade

final foi de 33% (Fig. 1A). Em plantas supridas com esse elemento, a severidade atingiu 5,6% (Fig. 1A). A AACPB em plantas supridas com Si foi reduzida em 89% em relação às plantas que não supridas com esse elemento (Fig. 1B). A concentração foliar de Si em plantas supridas com esse elemento foi de 4,7 dag/kg (Fig. 2), sendo 714% superior em relação ao obtido para as plantas não supridas com Si.

### **Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de MDA e atividade da LOX**

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas das plantas não supridas com Si permaneceu relativamente estável durante o período avaliado, porém houve decréscimo na concentração entre 60 e 84 hai e incremento a partir das 84 hai (Fig. 3A). Nas folhas das plantas supridas com Si, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou significativamente às 60 hai. Posteriormente, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decresceu rapidamente até às 132 hai em plantas supridas com Si. (Fig. 3A). A concentração de MDA nas plantas não supridas com Si foi significativamente maior às 36 e 132 hai em relação a plantas supridas com este elemento. Nas plantas supridas com Si, a concentração de MDA foi menor em todas as épocas avaliadas quando comparadas com plantas não supridas com Si. Nas plantas não supridas com Si, a atividade da LOX foi significativamente maior às 108 e 132 hai em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 3B e C).

### **Atividades da CAT, APX, GR e SOD**

A atividade da SOD foi constantemente maior nas plantas não supridas com Si do que nas plantas supridas com esse elemento, exceto às 60 hai. A atividade da SOD teve um pico de atividade significativamente maior em plantas não supridas com Si às 84 hai (Fig. 4A). Nas plantas supridas com Si, a atividade da SOD permaneceu estável durante o período avaliado. Houve aumento significativo na atividade da CAT nas plantas supridas com Si após às 60 hai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4B). Nas plantas não supridas com Si, a atividade da APX decresceu das 36 hai até às 108 hai, seguido de aumento às 132 hai (Fig. 4C). Apenas às 108 hai, a atividade da APX foi significativamente maior nas plantas supridas com Si em relação às plantas não

supridas com esse elemento (Fig. 4C). A atividade da GR aumentou até às 84 hai nas plantas não supridas com Si, seguida de queda às 108 hai. Diferenças significativas ocorreram apenas às 84 hai para as plantas não supridas com Si em relação às plantas que não receberam este elemento.

## **Discussão**

### **O sistema antioxidativo de plantas de arroz é afetado durante o processo infeccioso de *P. oryzae***

Os resultados aqui apresentados corroboram a hipótese de que plantas de arroz quando infectadas por *P. grisea* estão sujeitas ao estresse oxidativo devido à maior concentração de  $H_2O_2$  e atividade da LOX. Em plantas expostas a estresses, é comum a formação de EROs predominantemente representadas pelo superóxido ( $O_2^-$ ), pelo radical hidroxila (OH), pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e pelo oxigênio simples ( $^1O_2$ ), em diferentes compartimentos celulares (Mittler, 2002). As EROs são as principais responsáveis pela ocorrência de estresse oxidativo, já tendo sido inclusive demonstrado que a produção de peróxidos e radicais livres afeta maioria dos componentes celulares (Foyer et al., 1994), além de causarem a peroxidação dos lipídios (Liang, 1999; Mittler, 2002).

É interessante notar ainda que o  $O_2^-$  são bem mais tóxicos do que o  $H_2O_2$  e são formados pela ação da LOX. Esses superóxidos normalmente oxidam várias moléculas orgânicas a exemplo do ascorbato ou redutor de metais como o  $Fe_3^+$  nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (Van Breusegem et al., 2001). A ocorrência desses dois fenômenos favorece maiores concentrações de  $H_2O_2$  e maior atividade da LOX e, frequentemente, a peroxidação dos lipídios e a desintegração das membranas celulares (Mittler, 2002). No presente trabalho, uma vez que a concentração de MDA apresentou tendência de aumentar com o progresso da brusone. O MDA formado principalmente quando o  $H_2O_2$  é reduzido e removido pela APX usando o ascorbato como redutor é tido como um marcador da perda da integridade das membranas celulares (Mittler, 2002). O fungo *P. oryzae* por ser hemibiotrófico (Ebolle, 2007), em fases avançadas do processo infeccioso causa a morte de tecidos para nutrir-se, o que está associado com a desintegração das membranas celulares. Sekizawa et al., (1990) estudando o patossistema arroz-

*P. grisea* com interações compatíveis e incompatíveis na presença ou não do etileno, reportaram aumento na atividade da LOX com a evolução dos sintomas da brusone.

Para controlar os níveis das EROs e diminuir a toxicidade celular, às plantas desenvolveram um sistema antioxidante de proteção que incluem pequenas moléculas como ascorbato, glutatona, flavonóides, carotenóides e enzimas antioxidantes como SOD, CAT, APX, GR (Møller, 2001). No presente trabalho foi observado que em plantas infectadas por *P. oryzae* houve aumento na atividade da SOD ao passo que a atividade da catalase foi diminuída. Como o acúmulo de  $H_2O_2$  depende de duas etapas consecutivas na redução do oxigênio molecular a  $O_2^-$  seguido da dismutação de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , a maior atividade da SOD, acoplada a menor atividade da CAT, pode estar relacionada à maior concentração de  $H_2O_2$  em plantas infectadas por *P. grisea* com consequente ocorrência do estresse oxidativo. De fato, tem se demonstrado que a maioria do  $H_2O_2$  celular surge da dismutação do  $O_2^-$  catalisada pela SOD (Resende et al., 2003). Além disso, foi verificado que a atividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa parecem ser pouco afetadas em plantas infectadas por *P. oryzae*. Como as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa são importantes no processo de detoxificação do  $H_2O_2$  e tendo em vista que o  $H_2O_2$  pode se acumular em plantas infectadas por *P. oryzae* aventa-se para a hipótese de que as atividades dessas enzimas tornam-se limitantes em tecidos com sintomas de brusone. Assim, em plantas com sintomas da brusone pode ocorrer inibição da SOD onde os níveis de  $H_2O_2$  são mantidos elevados, o que passa a limitar a atividade da CAT.

### **O suprimento de Si atenua o estresse oxidativo decorrente da infecção por *P. oryzae* em plantas de arroz**

A redução no progresso da brusone e, consequentemente, na AACPB, nas plantas supridas com Si contribuiu detrimentalmente para que o estresse oxidativo fosse menor em plantas infectadas por *P. oryzae*. Nas plantas supridas com Si houve produção de  $H_2O_2$  durante a infecção por *P. oryzae*. Esse fato é importante uma vez que a explosão oxidativa e a geração de espécies ativas de oxigênio são características do estado de defesa da planta (Hammond-Kosack & Parker, 2003;

Jones & Dangl, 2006). No contexto da sinalização para respostas de defesa da planta ao patógeno, o  $H_2O_2$  desempenha papel importante dentre as EROs por causa da sua meia-vida relativamente longa e principalmente devido a sua alta permeabilidade através das membranas (Resende et al., 2003).

Sun et al. (2010) relatou que plantas supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae* produziram  $H_2O_2$  e maior peroxidação de lipídios. De acordo com esses autores, essas respostas podem estar ligadas a ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro potencializadas na presença do Si. O Si tem sido associado à alterações no metabolismo das plantas condicionando-as a tolerar diversos estresses, incluindo aqueles de natureza biótica (Brunings et al., 2009; Fauteux et al., 2005; Rodrigues et al., 2003a; 2003b; 2004a; 2004b; 2005). Embora a explosão oxidativa seja uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno, esta não está, no entanto, confinada à reação de hipersensibilidade (HR) no sítio de infecção, pois repetidas explosões secundárias podem ocorrer em sítios discretos e ou em tecidos distantes (Resende et al., 2003). A explosão oxidativa participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização que envolve o ácido salicílico e o cálcio citosólico na ativação dos mecanismos de defesa (Lamb & Dixon, 1997). Desse modo, avança-se para a hipótese de o pico de acumulação de  $H_2O_2$  pode ser um dos mecanismos pelos quais o Si estimula a maquinaria de defesa das plantas de arroz quando infectadas por *P. oryzae*.

A maior parte do  $H_2O_2$  acumulado em plantas de arroz inoculadas com *P. oryzae* pode ser resultado da atividade da SOD. No entanto, em plantas supridas com Si e inoculadas com *P. grisea*, a atividade da SOD foi mantida em valores bem menores do que em plantas não supridas esse elemento. Esse fato pode indicar que a produção de  $H_2O_2$  em plantas supridas com Si ocorre por via alternativa a dismutação de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  sem a participação da SOD e em velocidade bem menor (Lamb & Dixon, 1997). O acúmulo de  $H_2O_2$  em plantas supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae* pode ser rapidamente controlado pela CAT, uma vez que a atividade dessa enzima foi consideravelmente maior nas plantas supridas com Si às 84 hai, ou seja, o período que sucedeu aquele onde foi verificado um pico na concentração de  $H_2O_2$ . Isso indica que plantas supridas com

Si podem produzir mais  $H_2O_2$  como também regulá-lo temporalmente por intermédio da CAT. O  $H_2O_2$  pode atuar como sinalizador molecular exercendo papel na ativação de respostas de defesa sem comprometer a integridade das células (Lamb & Dixon, 1997). Pode ser que o  $H_2O_2$  tenha um papel importante nas plantas supridas com Si ativando vias de sinalização e respostas de defesa. Sun et al. (2010) relataram aumento na atividade de LOX e aumento na concentração de MDA em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo Si. Porém no presente estudo, a atividade da LOX decresceu e, conseqüentemente, a quantidade de MDA foi menor em plantas supridas com Si. Uma hipótese para explicar estes resultados seria que *P. oryzae* por ser um patógeno hemibiotrófico (Ebolle, 2007), na fase de necrotrófica a desintegração das membranas celulares do hospedeiro teria muito mais efeito para garantir nutrientes para o crescimento do fungo do que algum efeito na ativação de mecanismos de defesa. Além disso, uma menor atividade da LOX contribuiria para reduzir a geração de  $O_2^-$ . Decréscimo na permeabilidade das membranas e redução da peroxidação de lipídios têm sido relatados como efeitos induzidos pelo suprimento de Si no patossistema pepino-*Phytophthora melonis* (Mohaghegh et al., 2011).

O ciclo ascorbato-glutationa é o principal sistema de remoção das EROs nos cloroplastos e no presente estudo foi observado maior atividade para a APX nas plantas supridas com Si. No caso da GR, a atividade tendeu a ser menor nas plantas supridas com Si, embora em estádios mais avançados do processo infeccioso houve aumento em atividade. Desse modo, nas plantas supridas com Si, a detoxificação do  $H_2O_2$  parece ocorrer principalmente via atividade da CAT e APX uma vez que a atividade da GR foi menor nessas plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mohaghegh et al., (2011a) para o patossistema pepino-*Phytophthora melonis*. Os autores observaram que nas raízes das plantas supridas com Si tanto a CAT quanto a APX tiveram suas atividades aumentadas. Vale ressaltar que o Si parece exercer papel atenuador do estresse oxidativo não apenas em condições de estresse biótico, mas também de estresse abiótico como, por exemplo, salinidade e toxicidade por boro (Gunes et al., 2007). De acordo com Zhu et al., 2004 o Si contribuiu para a manutenção de muitas das funções

fisiológicas e bioquímicas das plantas tais como a atividade da LOX e das enzimas antioxidantes SOD, GR e APX aliviando, assim, o estresse oxidativo. Foi demonstrado também que na presença de altos níveis de sódio, a concentração de MDA e o extravasamento de eletrólitos foram menores em plantas de cevada supridas com Si do que em plantas não supridas com esse elemento (Liang, 1999; Liang et al., 2003; Liang et al., 1996). Além disso, Liang et al. (2006) relataram que na presença do Si, houve aumento na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática e, conseqüentemente, maior estabilidade dos lipídios nelas contidos. Assim, é plausível concluir que na presença do Si, o estresse oxidativo das plantas infectadas por *P. oryzae* é possível de ser reduzido mediante regulação na concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menor atividade da SOD via estimulação na atividade da CAT e APX.

## Referências

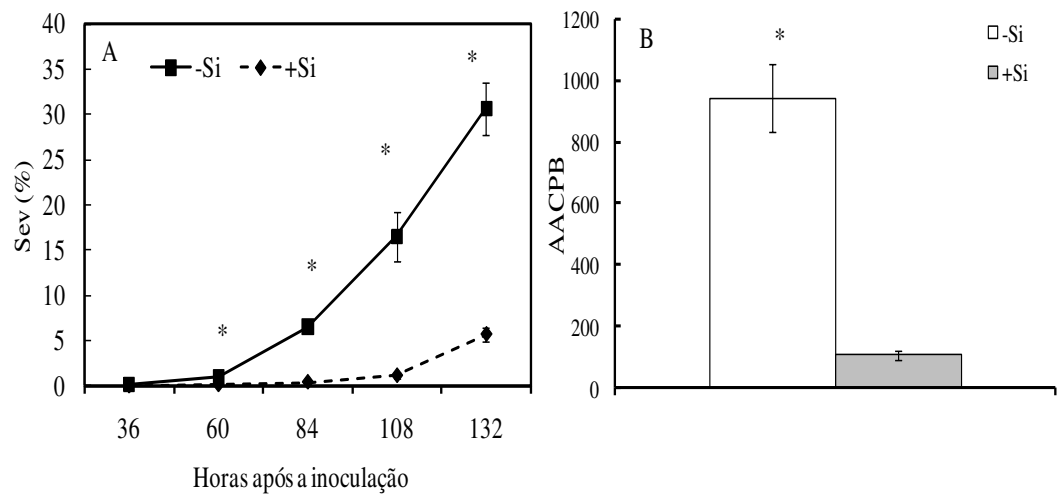
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laasko S (1981) Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymol* 71: 441-451
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*; 72: 248-254
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol* 155: 161-170
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide-dismutase, catalase, and peroxidases activities in root-tips of soybean (*Glycine-Max*). *Physiol Plantarum* 83: 463-468
- Ebolle DJ (2007) *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review Phytopathology* 45: 437-456
- Fauteux F, Remus-Borel W, Menzies JG, Belanger RR (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *Fems Microbiol Lett* 249: 1-6

- Foyer CH, Halliwell B (1976) Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative Stress in Plants. *Physiol Plantarum* 92: 696-717
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314
- Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O (2007) Silicon increases boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron. *Biol Plantarum* 51: 571-574
- Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32
- IRRI I (ed) (1996) Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nola A (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. *Boletim Técnico* 1, Grupo de Pesquisa em Silício ICIAG-Universidade Federal de Uberlândia: 28
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Phys* 48: 251-275
- Lee CB, Lee DH (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci* 159: 75-85
- Liang YC (1999) Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant Soil* 209: 217-224
- Liang YC, Chen Q, Liu Q, Zhang WH, Ding RX (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* 160: 1157-1164

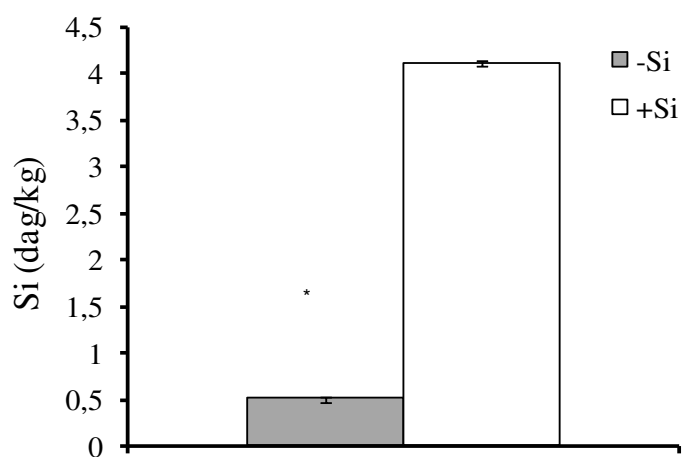
- Liang YC, Shen QR, Shen ZG, Ma TS (1996) Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. *J Plant Nutr* 19: 173-183
- Liang YC, Zhang WH, Chen Q, Liu YL, Ding RX (2006) Effect of exogenous silicon (Si) on H<sup>+</sup>-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ Exp Bot* 57: 212-219
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff LE, Korndorfer GH, Snyder GH (eds) *Silicon in agriculture*. Elsevier Science, The Netherlands, pp 17-39
- Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA (2011) Different responses of Superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtibolum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative stress. *Plant Sci* 160: 505-515
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh AH, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N (2011) Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Dis* 95: 455-460
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 52: 561-591
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM (2003) Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93: 535-546

- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant P* 66: 144-159
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N, Menzies JG, Belanger RR (2004a) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94: 177-183
- Rodrigues FA, Rollins JA, Datnoff LE, Jurick WM, Jones JB (2004b) Cytological and molecular aspects of silicon-mediated resistance to rice blast. *Phytopathology* 94: S88-S88
- Rodrigues FA, Vale FXR, Datnoff LE, Prabhu AS, Korndorfer GH (2003b) Effect of rice growth stages and silicon on sheath blight development. *Phytopathology* 93: 256-261
- Sekizawa Y, Haruyama T, Kano H, Urushizaki S, Saka H, Matsumoto K, Haga M (1990) Casualty analysis on cascades of reactions in the induced defense-mechanism of rice plant .7. Dependence on ethylene of the induction of peroxidase and lipoxygenase activity in rice leaf infected with blast fungus. *Agr Biol Chem Tokyo* 54: 471-478
- Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system). <http://www.statsoft.com>
- Sun WC, Zhang J, Fan QH, Xue GF, Li ZJ, Liang YC (2010) Silicon-enhanced resistance to rice blast is attributed to silicon-mediated defence resistance and its role as physical barrier. *Eur J Plant Pathol* 128: 39-49
- Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inze D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161: 405-414
- Yan B, Dai Q, Liu X, Huang S, Wang Z (1996) Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant Soil* 179: 261-268

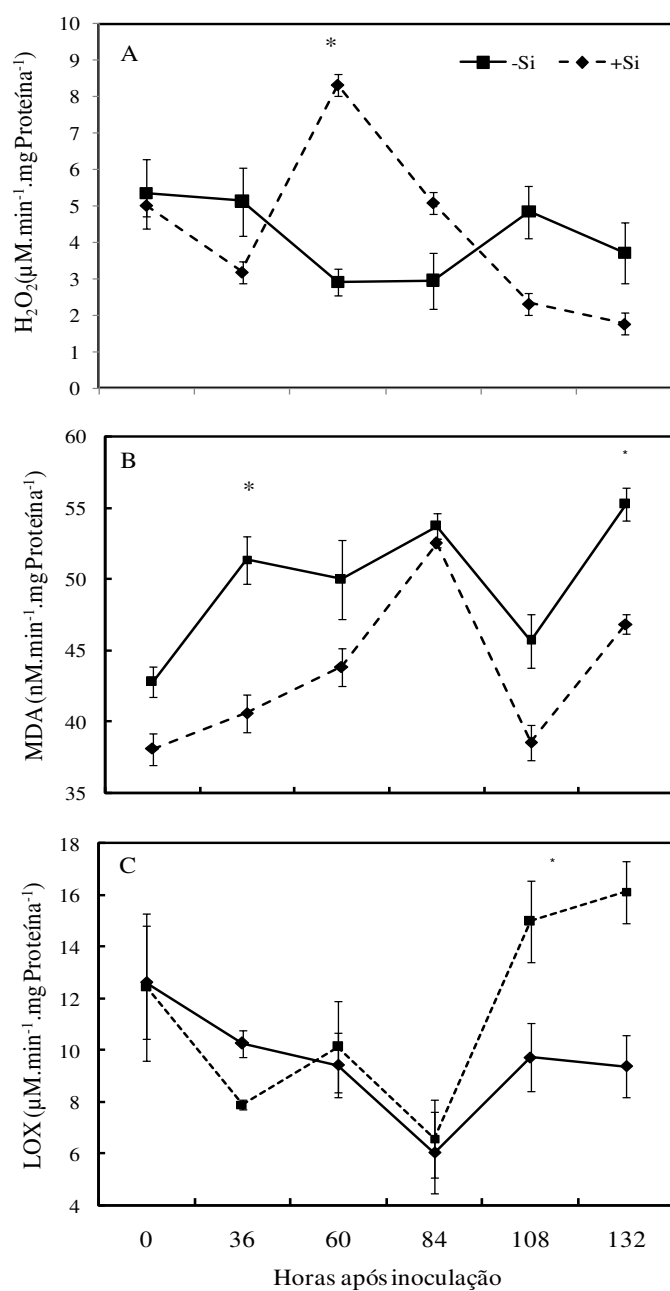
Zhu ZJ, Wei GQ, Li J, Qian QQ, Yu JQ (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci* 167: 527-533



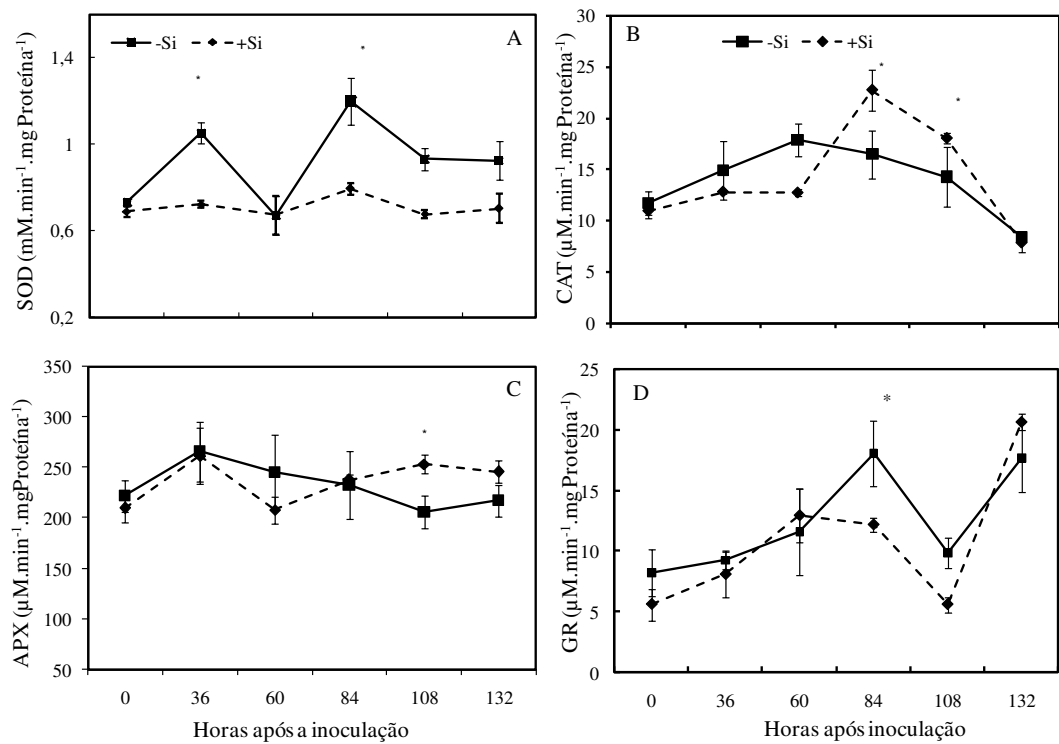
**Fig 1.** A Curvas de progresso da brusone (A) e área abaixo da curva de progresso da brusone (AACPB) (B) em plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo (+Si) ou não (-Si) silício (Si). Barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Em A, cada ponto representa a média de seis repetições. Em B, *n* = 30 para cada tratamento.



**Fig 2.** Concentração foliar de silício (Si) em plantas supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com Si. As barras representam o erro padrão. Médias seguidas de asterisco (\*) entre os tratamentos -Si e +Si são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.



**Fig 3.** Concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (A) de aldeído malônico (MDA) (B) e atividade da lipoxigenase (LOX) (C) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Pyricularia. oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias entre os tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas por um asterisco (\*) diferem significativamente pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.



**Fig 4.** Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), ascorbato peroxidase (APX) (C) e glutationa-redutase (GR) (D) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Pyricularia. oryzae*. Cada ponto representa a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão. Médias entre os tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas por um asterisco (\*) diferem significativamente pelo teste-*t* a 5% de probabilidade.

## **CAPÍTULO 3**

### **STATUS NUTRICIONAL DE PLANTAS DE ARROZ SUPRIDAS COM SILÍCIO E INOCULADAS COM *Pyricularia oryzae***

**Resumo** - O patossistema arroz-*Pyricularia oryzae* tem sido foco de inúmeros estudos recentemente. Muitos desses estudos estão relacionados ao suprimento de Silício (Si), como forma de reduzir a severidade da brusone. No entanto, muito pouco se conhece sobre o efeito deste elemento em processos fisiológicos de plantas sob infecção e também sobre o efeito da brusone sobre esses mesmos processos. Tendo em vista a falta de estudos, que avalie os efeitos da infecção por *P. oryzae*, da aplicação de Si e da interação desses fatores, o objetivo desse trabalho foi determinar o perfil nutricional de plantas de arroz em função do suprimento de Si e/ou da inoculação de *P. oryzae*. Em conjunto os resultados desse estudo indicam que tanto a infecção por *P.oryzae* quanto o suprimento de Si reduz de maneira geral a concentração de macro e micronutrientes; embora decrescidos os níveis nutricionais estejam dentro da faixa considerada adequada para cultura. O crescimento e desenvolvimento de plantas supridas com Si é maior que plantas não supridas com esse elemento, mesmo aquelas apresentando concentrações de nutrientes menores que estas e a resistência mediada pelo Si de plantas de arroz a infecção de *P. oryzae*, não esta relacionada com aumentos na concentração de nutrientes e sim redução na concentração dos mesmos.

## Introdução

O silício (Si) é o segundo elemento mineral mais abundante nos solos perfazendo, aproximadamente, 28% da crosta terrestre sendo o óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) o mineral mais abundante nos solos, constituindo a base da estrutura da maioria dos argilominerais (Elawad & Green, 1979; Epstein, 1999). Como um dos principais constituintes inorgânicos das plantas superiores, o Si é depositado nas plantas na forma de sílica gel amorfa ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), sendo absorvido pelas plantas, a partir da solução do solo, na forma de ácido monossilícico (Tisdale et al., 1993). No interior da planta, 99% do total acumulado de Si, encontra-se na forma de ácido silícico polimerizado, o qual é de difícil solubilização, sendo o restante, menos de 1%, encontrado na forma coloidal ou iônica (Yoshida, 1975). Existem na literatura inúmeros trabalhos relatando o benefício desse elemento, dentre esses incluem o aumento na resistência de várias espécies de plantas à estresses abióticos e ou bióticos (Liang et al., 2007; Ma & Yamaji, 2006). Importantes doenças em arroz, cevada, milho, pepino, uva e morango têm sido eficientemente controladas pelo suprimento de Si (Datnoff et al., 2007). No caso do arroz, já foi demonstrado que vários componentes de resistência foram significativamente afetados quando as plantas foram supridas com Si (Seebold et al., 2001). Além disso, existem evidências de que o Si pode potencializar respostas de defesa como a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas com a patogênese possuindo, não apenas um papel passivo na resistência na forma de barreira física, mas também um papel ativo (Rodrigues et al., 2003; 2004a,b,c,2005). Vários estudos têm demonstrado os efeitos da nutrição mineral sobre o crescimento e a produtividade de muitas espécies de plantas, muitos deles com ênfase nas funções dos nutrientes no metabolismo (Walters & Bingham, 2007). No entanto, são poucos os trabalhos que visam correlacionar a infecção por patógenos com o perfil nutricional das plantas na presença de Si. Tamai & Ma (2008) estudando o efeito do Si em cultivos de arroz em campo usando plantas do mutante defeutivo na absorção desse elemento mediada por dois transportadores  $Lsi_1$  e  $Lsi_2$  e plantas do tipo selvagem observaram que as concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) foram similares tanto nas plantas do mutante quando do tipo selvagem nos diferentes estágios de crescimento indicando, assim, que o Si não

interferiu na absorção e nem mesmo na concentração foliar desses nutrientes. Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada no peso da matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas do mutante e do tipo selvagem. Posteriormente, Gao et al (2011) demonstraram que o Si em plantas de arroz infectadas por *Pyricularia oryzae* e supridas com Si houve redução na absorção de nutrientes. No entanto, esses autores concentraram os estudos apenas no potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe) que, de certa forma, limita generalizar os resultados considerando existem 17 nutrientes considerados essenciais às plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

Tendo em vista a ausência de estudos avaliando o efeito do Si no estado nutricional de plantas de arroz quando infectadas por *P. oryzae*, esse trabalho objetivou determinar o balanço nutricional em termos de plantas não inoculadas e inoculadas com *P. oryzae* e supridas ou não com Si em termos da concentração de macro e de micronutrientes.

## **Material e Métodos**

### **Crescimento das plantas de arroz**

Sementes de arroz (cv. Metica-1) foram submetidas à desinfestação superficial com uma solução de 10% vol de NaOCl por 3 min. Em seguida, as sementes foram lavadas em água estéril e semeadas em bandejas contendo areia. Aos 5 dias após germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 litros de solução nutritiva a 1/2 força iônica. A solução nutritiva foi baseada naquela desenvolvida por Hoagland & Arnon (1950) com algumas modificações e incluíram os macronutrientes: 1 M/L KNO<sub>3</sub>, 0,25 M/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M/L NH<sub>4</sub>Cl, 1 M/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, e 1,0 M/L Ca<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>).4H<sub>2</sub>O e os seguintes micronutrientes: 0,30 mM/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,33 mM/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 11,5 mM/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,5 mM/L MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,1 mM/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 25 mM/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 25 mM/L EDTA Bisódico. Após sete dias, a concentração da solução utilizada foi modificada para força total, adicionando-se ou não o ácido monossilícico. O ácido monossilícico, usado como fonte de Si, foi preparado passando o silicato de potássio em resina de troca catiônica (Amberlite IR-120B, H<sup>+</sup> forma; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Ma et al., 2001). As doses de Si

usadas foram 0 ou 2 mM/L. A solução nutritiva, sem aeração, foi trocada a cada quatro dias e o pH verificado diariamente e mantido entre 5,5 e 6,0 usando HCl ou NaOH M quando necessário.

### **Inoculação e avaliação da severidade da brusone**

As plantas de arroz foram inoculadas aos 45 dias após o transplântio com um isolado monospórico de *P. oryzae* (CNPAF-1048) cedido pela EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás. O isolado foi preservado em papel filtro e armazenado em freezer a -20°C. Pedacos de papel filtro contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Após 10 dias, discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio de aveia e armazenadas a 25°C por 15 dias. Após esse período, as placas contendo o micélio do fungo foram submetidas à raspagem superficial e deixadas abertas expostas a luz continua por 3 dias para a produção de conídios. A suspensão de conídios foi obtida pela adição de, aproximadamente, 10 mL de água destilada com 1% (p/v) de gelatina, em cada placa, seguido de raspagem superficial com um pincel de cerdas macias. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em gaze para remoção de micélio e fragmentos de BDA. Em seguida, a concentração da suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^5$  conídios/mL em hemacitômetro. Foi adicionado 0,1 mL de Tween 80 para reduzir a tensão superficial na superfície foliar. A inoculação das plantas foi realizada com aerógrafo pressurizado (Paasche Airbrusch Co., Chicago, EUA). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade relativa de  $90 \pm 5\%$ , temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro onde permaneceram até o final das avaliações.

A severidade da brusone foi avaliada às 36, 60, 84, 108 e 132 horas após inoculação (hai) utilizando-se a escala proposta pelo “International Rice Research Institute” (IRRI, 1996). Os dados obtidos foram usados para calcular a área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB) por meio de integração trapezoidal (Shaner & Finney, 1977).

## **Determinação das concentrações foliares de Si, macronutrientes, micronutrientes e peso da matéria seca das plantas**

Partes das folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água deionizada, secas em estufa por um período de 72 horas a 65°C e, posteriormente, trituradas em moinho tipo Thomas-Wiley. A concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica conforme proposto por Korndörfer et al. (2004). A concentração foliar de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn e Cu foi determinada usando espectrometria de absorção atômica conforme descrita por Malavolta et al., (1997). A concentração de B foi determinada colorimetricamente Bataglia & Raij, 1990 conforme descrito por O peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular das plantas das repetições de cada tratamento foi determinado bem como a razão parte aérea/raiz. Para tal, as plantas foram cortadas e suas respectivas partes foram acondicionadas em sacos de papel, os quais foram mantidos em estufa de circulação forçada de ar com temperatura de 65°C até atingir peso constante.

## **Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial 2 × 2 com seis repetições. Os fatores estudados foram: doses de Si (0 e 2 mMol/L) e plantas inoculadas ou não inoculadas com *P. oryzae*. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo cinco plantas. Os dados das concentrações foliares de Si e de macro e micronutrientes foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o software STATISTICA (StatSoft, 2004). A concentração foliar de Si foi correlacionada com a AACPB.

## **Resultados**

### **Área Abaixo da Curva do Progresso da Brusone**

A AACPB de plantas não supridas com Si foi de 945,7 e de plantas supridas com Si 108,8. A AACPB em plantas supridas com Si foi reduzida em 89% em relação às plantas não supridas com esse elemento.

### **Concentrações foliares de Si e de macro e micronutrientes**

A concentração foliar de Si em plantas supridas ou não com esse elemento foi de 3,51% e 0,14% respectivamente (Tabela 2), ou seja, houve um aumento de 714% em plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. A concentração de macronutrientes diferiu significativamente para os fatores doses de Si e plantas inoculadas ou não com *P. oryzae*, exceto para o Ca e o Mg. Para esses dois macronutrientes, houve diferença significativa apenas para o fator doses de Si (Tabela 1). Houve interação significativa entre os fatores doses de Si e plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* para o macronutriente S (Tabela 1). A concentração de macronutrientes foi, em geral, maior para as plantas não inoculadas com *P. oryzae* e não supridas com Si quando comparadas com as plantas inoculadas e supridas com esse elemento (Tabela 2). Proporcionalmente, as maiores reduções ocorrem para a concentração de K nas plantas inoculadas com *P. oryzae* e supridas com Si (21 e 28%, respectivamente) e N (20 e 26%, respectivamente). Para a concentração de S, houve diferença significativa apenas para o fator doses de Si e para a interação doses de Si × plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* (Tabela 3). Para o caso do Cu, houve diferença significativa apenas para os fatores doses de Si e plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* (Tabela 3). No caso do B e do Si, houve diferença significativa somente para o fator doses de Si (Tabela 3). A concentração desses elementos apresentou, em geral, a mesma tendência observada para os macronutrientes, sendo maior nas plantas não inoculadas com *P. oryzae* e não supridas com Si quando comparadas com as plantas inoculadas e supridas com Si (Tabela 2). Proporcionalmente, a maior redução na concentração de micronutrientes em plantas infectadas por *P. oryzae* ocorreu para o Cu (19%) em relação a plantas não inoculadas e quando foi considerado plantas supridas com Si, a concentração de Cu foi reduzida em 28% em relação às plantas não supridas com Si.

No caso do Zn, Fe e Mn, houve diferença significativa para os fatores doses de Si e plantas inoculadas ou não com *P. grisea* e para a interação desses fatores (Tabela 3). Para a concentração de S, houve diferença significativa apenas para o fator doses de Si e para a interação doses de Si × plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* (Tabela 3). A concentração de Zn nas plantas não supridas com Si foi

21% superior em relação as plantas inoculadas com *P. oryzae* (Tabela 4). Para plantas supridas com Si, independentemente da inoculação ou não com *P. oryzae*, a concentração de Zn foi reduzida em relação as plantas não inoculadas e não supridas com Si. Nas plantas não inoculadas com *P. oryzae* e não supridas com Si, a concentração de Zn foi 41% superior do que a concentração desse micronutriente nas plantas supridas com Si (Tabela 4). Para as plantas inoculadas com *P. oryzae* e não supridas com Si, a concentração de Zn foi 35% superior em relação às plantas não supridas com esse elemento (Tabela 4).

Não houve diferença significativa para a concentração de Fe nas plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* e não supridas com Si (Tabela 4). Contudo, na presença de Si, as plantas inoculadas com *P. oryzae* tiveram a concentração de Fe aumentada em 3% em relação às plantas não inoculadas. Houve diferença significativa para a concentração de Fe nas plantas não inoculadas com *P. oryzae* supridas ou não com Si (Tabela 4). Houve acréscimo de 57% na concentração de Fe nas plantas não supridas com Si em relação aquelas supridas com esse elemento. Já nas plantas inoculadas com *P. oryzae* e supridas ou não com Si, não houve diferença significativa para a concentração de Fe (Tabela 4).

Para a concentração de Mn nas plantas não inoculadas com *P. grisea*, houve diferença significativa para o fator doses de Si (Tabela 4). Nas plantas não inoculadas com *P. oryzae* e não supridas com Si, a concentração de Mn foi 82% superior em relação às plantas não inoculadas com *P. oryzae* e supridas com Si (Tabela 4). Para as plantas não supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae*, houve decréscimo na concentração de Mn, sendo que a concentração desse micronutriente foi 38% menor nas plantas não inoculadas. Já nas plantas supridas com Si, embora a inoculação com *P. oryzae* tenha proporcionado um decréscimo na concentração de Mn, esse foi 34% inferior ao observado para as plantas não supridas com Si (Tabela 4). Houve diferença significativa para a concentração de S nas plantas inoculadas com *P. oryzae* supridas ou não com Si (Tabela 4). Houve decréscimo de 18% na concentração de S nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. Nas plantas supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae*, a concentração de S foi 14% menor do que nas plantas não inoculadas (Tabela 4).

### **Peso da matéria seca**

Nas plantas supridas com Si houve aumento significativo nos valores das variáveis MSPA, MSR, MST e na razão PA/R em relação a plantas que não receberam este elemento (Tabela 6). A MSPA, MSR, MST e a razão PA/R aumentaram em 69,92; 55,71; 76,91; 35,71 respectivamente em relação a plantas não supridas com esse elemento.

### **Correlação entre a concentração foliar de Si com a AACPB**

Considerando conjuntamente plantas inoculadas ou não com *P. oryzae* observa-se a existência de correlação positiva e significativa entre AACPB e a concentração foliar de Si  $r = -0,91$   $p = 0,001$  (Tabela 5). Para esses elementos, à medida que suas concentrações aumentam à AACPB também aumenta.

### **Discussão**

Vários estudos têm demonstrado os efeitos da nutrição mineral sobre o crescimento e a produtividade de muitas espécies de plantas, muitos deles com ênfase nas funções dos nutrientes no metabolismo (Fageria, 1998). Porém, na literatura são poucos os trabalhos que visam associar a infecção por patógenos com o perfil nutricional das plantas (Gao et al., 2011). Neste sentido, é importante destacar que o presente trabalho aborda tanto o balanço nutricional às plantas de arroz infectadas por *P. oryzae* quanto o papel do Si nessa interação.

Verificou-se que as concentrações foliares de N, P, K, Ca e Mg nas plantas não supridas com Si ou não inoculadas com *P. grisea* foram superiores as concentrações desses elementos nas plantas supridas com Si e não inoculadas com *P. oryzae*. Assim tanto na presença de *P. oryzae* e do Si, ocorreu decréscimo na concentração foliar desses macronutrientes. Essa informação é importante, pois maiores concentrações de nutrientes estão, em alguns casos, relacionados à maior suscetibilidade das plantas a vários patógenos (Datnoff et al., 2007).

Altas concentrações estão relacionadas a decréscimos na resistência de várias plantas a patógenos (Mascagn et al., 1997; Talukder et al., 2005). Um caso clássico é a redução da resistência de plantas de trigo ao oídio (Hoffland et al.,

2000) e a *Puccinia recondita* (Mascagn et al., 1997). No caso do patossistema arroz-*P. oryzae* já foi demonstrado que um excesso de adubação nitrogenada pode aumentar a severidade da brusone (Ahn & Mukelar, 1986; Kurschner et al., 1992). Tendo em vista a menor concentração de N nas plantas supridas com Si, a manutenção deste macronutriente pode estar relacionada com a resistência de plantas de arroz à brusone. Isso também pode estar relacionado com uma menor concentração de N propiciada pelo Si. Uma menor concentração de N pode resultar em menor desenvolvimento de *P. oryzae* nos tecidos resultando em uma menor severidade da doença como mostram os resultados desse trabalho.

É importante destacar que como as análises nutricionais foram realizadas no estágio de máximo perfilhamento das plantas e essas coletadas aos 7 dias da inoculação com *P. oryzae*, pode ser que com o progresso da doença ao longo dos estágios fenológicos, a concentração desse nutriente decresceu a níveis críticos ou até mesmo a deficiência em plantas não supridas com Si e inoculadas com *P. oryzae*. No que concerne o efeito do P na interação patógeno-hospedeiro a literatura é contraditória. Muitos relatos indicam que aumentos na concentração de P estão relacionados a aumentos concorrentes na severidade de doenças enquanto outros indicam que com o aumento na concentração deste nutriente ocorre redução nos níveis de doenças (Prabhu et al., 1999). No caso específico da brusone do arroz, ambos os resultados já foram encontrados, o que torna complicado uma avaliação criteriosa. Um dos estudos, por exemplo, mostra que o aumento da severidade da brusone na panícula de arroz é positivamente correlacionada com um aumento nas concentrações de P, N e Mg (Fillipi & Prabhu, 1998).

Com relação ao K, alguns trabalhos têm demonstrado que em arroz uma redução na concentração deste elemento aumenta a suscetibilidade das plantas a *P. grisea* (Ou, 1985; Prabhu et al., 1999). Prabhu et al., (1999) relacionando o óxido de potássio com a brusone da panícula sob três diferentes doses de N, concluíram que na ausência de fontes adicionais de N, a fertilização com K reduziu a severidade da brusone. Esse fato é interessante, pois no presente trabalho, verificou que plantas inoculadas com *P. oryzae* tiveram concentrações de K significativamente inferiores ao observado para as plantas não inoculadas.

Esse decréscimo pode ser resultante do próprio desenvolvimento de *P. oryzae* que em fase iniciais da infecção é um patógeno biotrófico, suprimindo respostas de defesa do hospedeiro (Divon & Flurhr, 2007). Por outro lado, em plantas supridas com Si, também foi verificado uma redução significativa na concentração desse elemento e também de N. Corroborando com os resultados de Kozaka (1965) e Prabhu et al., (1999). Nesse caso em plantas supridas com Si houve um balanço entre N e K, desfavorecendo o progresso da brusone

Com relação ao Ca e ao Mg, verificou-se que a infecção por *P. oryzae* parece não ter afetado as concentrações, e que essas variaram apenas em função do suprimento de Si. A suscetibilidade de plantas a alguns patógenos é inversamente relacionada com o teor de cálcio nos tecidos vegetais. Este nutriente é essencial para formar poligalacturonatos de cálcio, requeridos na lamela média para estabilidade da parede celular (Marschner, 1995). É, no entanto, reconhecido que o Si pode se associar com carboidratos e ligninas da parede celular competindo por sítios de Ca na parede (Inanaga & Okasaka, 1995). Esse pode ser um dos mecanismos pelos quais o Si decresceu a absorção de Ca. O papel do Ca e do Mg não tem sido bem documentado, embora alguns estudos indiquem que esses elementos atuem em nível molecular como importantes sinalizadores e co-fatores enzimáticos (Roberts & Harmon, 1992). No contexto mais aplicado, alguns estudos realizados por (Huber, 1981) indicou, por exemplo, que ocorrem reduções na incidência do mal do pé em trigo causada por *Gaeumannomyces graminis* fsp. *tritici* quando as plantas foram supridas com cloreto de magnésio em solo deficiente em Mg. Esse fato pode estar relacionado com o efeito direto do Mg uma vez que esse elemento pode aumentar a resistência dos tecidos em resposta a enzimas pectolíticas produzidas por patógenos (Mcguire & Kelman, 1986), além de possivelmente atuar como co-fator de inúmeras enzimas envolvidas nas respostas de defesa.

Gao et al (2011) estudaram a influência da inoculação de *P. oryzae* e do suprimento de Si no balanço nutricional de K, Na, Ca, Mg e Fe. De acordo com esses autores, nas plantas não inoculadas, e supridas com Si não houve alteração na concentração desses nutrientes. Porém em plantas inoculadas e a inoculação houve um aumento na concentração de nutrientes e o suprimento de Si em plantas

inoculadas promoveu um ajuste no balanço desses nutrientes. Diferentemente, os dados do presente estudo indicam que o Si interferiu na concentração desses mesmos nutrientes, mesmo em plantas não inoculadas com *P. oryzae*. Também não foi verificado aumento na concentração desses nutrientes em plantas inoculadas. Tais diferenças encontradas no presente estudo com aquelas relatadas na literatura podem ser devido à diferença de cultivares que podem responder diferencialmente tanto a nutrição mineral quanto a infecção por *P. oryzae*, ou mesmo o isolado utilizado que pode induzir modificações nutricionais distintas. Idade da planta e sistema de cultivo também podem influenciar na absorção dos elementos (Taiz & Zeiger, 2004).

Nas plantas supridas é provável que ocorra uma interferência na absorção dos outros elementos, pois foi verificada interação significativa entre os fatores inoculação e suprimento de Si para (Zn, Fe, Mn, S), pois a concentração de nutrientes nas plantas supridas com Si e inoculadas com *P. grisea* foi semelhante ao obtido para plantas não inoculadas. Por outro lado, a concentração de nutrientes em plantas não supridas com Si e inoculadas com *P. grisea* foi diferente do observado para as plantas não inoculadas. Outro ponto relevante é que em plantas supridas com Si, independentemente da inoculação com *P. oryzae*, a concentração de micronutrientes foi menor do que o observado em plantas não supridas com Si e inoculadas ou não com *P. oryzae*. Esse fato é bastante relevante, pois indica que o Si pode interferir ativamente na absorção de micronutrientes. O ácido monossilícico pode reagir com outros metais como o ferro, manganês, cádmio, chumbo, zinco, mercúrio dentre outros, formando silicatos com esses metais (Epstein, 1999). Com uma concentração elevada de ácido monossilícico pode ocorrer precipitação dos metais pesados com uma baixa proporção de silicatos solúveis (Epstein, 1999). No entanto, embora decrescidas, as concentrações dos elementos estes estão dentro dos níveis adequados para o arroz, o que pode indicar que plantas de arroz supridas com Si e ou infectadas por *P. grisea* não sofrem déficit nutricional (IRRI, 1996). Isso é importante, pois os micronutrientes estão relacionados a inúmeras funções metabólicas nas plantas (Taiz & Zeiger, 2004) influenciando os eventos decorrentes da interação planta-patógeno (Datnoff et al., 2007). Esse fato é ainda corroborado pelos resultados da

matéria seca indicando que plantas supridas com Si produziram mais matéria seca, mesmo tendo as concentrações de nutrientes diminuídas em relação às plantas não supridas com Si e não inoculadas com *P.oryzae* (Rodrigues et al., 2001).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a resistência o arroz a brusone mediada pelo Si pode estar relacionada com o decréscimo nas concentrações de nutrientes, embora sem detrimento ao crescimento da planta por qualquer deficiência nutricional.

### **Referências**

- Ahn S, Mukelar A (Eds) (1986) Rice blast control by nitrogen management under conditions. Jakarta Conf. IRRI Manila, Phillipines pp 363-374
- Bataglia, O.C.; Raij, B. van. (1990) Eficiência de extratores na determinação de boro em solos. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.14, n.1, p.25-31
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW (2007) Silicon and Plant Disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds) Mineral Nutrition and Plant Disease. APS Press, St Paul, MN, USA, pp 233-246
- Divon HH, Flurhr R (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. FEMS Microbiol Letters 266: 65-74
- Elawad SH, Green VE (Eds) (1979) Silicon and the rice plant environment, Milano Epstein E (1999) Silicon. Annual Review of Plant Physiology 50: 641-664
- Fageria NK (1998) Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental 2: 6-16
- Filippi MC, Prabhu AS (1998) Relationship between panicle blast severity and mineral nutrient content of plant tissue in upland rice. Journal of Plant Nutrition 21: 1577-1587
- Gao D, Cai K, Chen J, Luo J, Zeng R, Yang R, Zhu X (2011) Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. Acta Physiology Plantarum 33: 675-682

- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347: 1-32
- Hoffland E, Jeger MJ, van Beusichem ML (2000) Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil* 218: 239-247
- Huber DM (ed) (1981) The role of mineral nutrients and agricultural chemicals in the incidence and severity of take-all. London pp 317-341
- Inanaga S, Okasaka A (1995) Calcium and silicon binding compounds in cell walls of rice shoots. *Soil Science and Plant Nutrition* 41: 103-110
- IRRI I (ed) (1996) Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nola A (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. *Boletim Técnico 1, Grupo de Pesquisa em Silício ICIAG-Universidade Federal de Uberlândia*: 28
- Kozaka T (ed) (1965) Control of rice blast by cultivation practices in Japan, Baltimore
- Kurschner E, Bonmam JM, Garrity DP, Tamisin MM, Pabale D, Estrada BA (1992) Effects of nitrogen timing and split application on blast disease in upland rice. *Plant Disease* 76: 384-389
- Liang YC, Sun WC, Zhu YG, Christie P (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environ Pollut* 147: 422-428
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff LE, Korndörfer GH, Snyder GH (eds) *Silicon in agriculture*. Elsevier Science, The Netherlands, pp 17-39
- Ma JF, Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci* 11: 392-397
- Malavolta E, Vitti GS, Oliveira de SA (Eds) (1997) *Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações*. Potafos, Piracicaba
- Marschner H (ed) (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, New York
- Mascagn iHJJ, Harrison SA, Russin JS, Desta HM, Colyer PD, Habetz RJ, Hallmark WB, Moore SH, Rabb JL, Hutchinson RL, Boquet DJ (1997)

- Nitrogen and fungicide effects on winter wheat produced in the Louisiana Gulf Coast region. *Journal of Plant Nutrition* 20: 1375–1390
- Mcguire RG, Kelman A (1986) Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology* 76: 401-406
- Ou SH (ed) (1985) *Rice Diseases*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Great Britain
- Prabhu AS, Barbosa Filho MF, Filippi MC, F.J.P. Z (1999) Relationship between potassium fertilization and panicle blast severity in upland rice. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34: 1729-1732
- Roberts DM, Harmon AC (1992) Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 375-414
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93: 535-546
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant P* 66: 144-159
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbe C, Benhamou N, Menzies JG, Belanger RR (2004b) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94: 177-183
- Rodrigues FA, Rollins JA, Datnoff LE, Jurick WM, Jones JB (2004c) Cytological and molecular aspects of silicon-mediated resistance to rice blast. *Phytopathology* 94: S88-S88
- Seebold KW, Kucharek TA, Datnoff LE, Correa-Victoria FJ, Marchetti MA (2001) The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91: 63-69
- Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.

- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system).  
<http://www.statsoft.com>
- Taiz L, Zeiger E (eds) (2004) Fisiologia vegetal, Porto Alegre
- Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH (2005) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. *New Phytologist* 168: 455–464
- Tamai K, Ma J (2008) Reexamination of silicon effects on rice growth and production under field conditions using a low silicon mutant. *Plant and Soil* 307: 21-27
- Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD, Halvin JL (1993) Soil Fertility and Fertilizers. Macmillan Publishing Company, New York
- Walters DR, Bingham IJ (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals Applied Biology* 151: 307-324
- Yoshida S (ed) (1975) The Physiology of Silicon in Rice. Food Fert. Tech. Centr. Taipei, Taiwan. (Technical bulletin, 25).

**Tabela 1.** Análise de variância do efeito dos fatores doses de silício (Si) e inoculação ou não com *Pyricularia oryzae* e para a interação desses fatores na concentração foliar de seis macronutrientes.

Fontes de variação	gl <sup>§</sup>	Valor de <i>F</i>					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Doses de Si (Si)	1	23,66**	29,37**	90,41**	22,61**	21,58**	6,56*
Inoculação ou não com <i>P. oryzae</i> (I)	1	39,25**	10,59**	39,25**	0,22 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	1,11 <sup>ns</sup>
Si x I	1	0,72 <sup>ns</sup>	0,59 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>ns</sup>	2,96 <sup>ns</sup>	5,14*
Resíduo	20	-	-	-	-	-	-

<sup>§</sup> graus de liberdade

\*\* Valores significativos a 5% de probabilidade pelo teste *F*

<sup>ns</sup> Valores não significativos a 5% de probabilidade pelo teste *F*

**Tabela 2.** Concentração foliar de macro, micronutrientes e de silício em plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae*.

Fatores	Concentração (dag/kg)							
	N	P	K	Ca	Mg	Cu	B	Si
-Si	3,59a	0,57a	3,50a	0,58a	0,57a	14,36a	16,35a	3,51a
+Si	3,01b	0,53b	2,52b	0,48b	0,48b	10,25b	9,49b	0,14b
Plantas não inoculadas	3,67a	0,56	3,29a	0,54a	0,54a	13,6a	13,0a	1,9a
Plantas inoculadas	2,93b	0,53	2,57b	0,52a	0,52a	11,0b	12,8a	1,8a
C.V. (%)	8,73	3,94	8,37	10,28	9,26	15,28	16,63	11,77

C.V. – coeficiente de variação

Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de F.

**Tabela 3.** Análise de variância do efeito dos fatores doses de silício (Si) e inoculação ou não com *Pyricularia oryzae* e para a interação desses fatores na concentração foliar de micronutrientes e silício.

Fonte de variação	gl <sup>§</sup>	Zn	Fe	Mn	Cu	B	Si
Doses de Si (Si)	1	173,19**	35,34**	113,76**	28,61**	61,08**	1476,03**
Inoculação ou não com <i>P.oryzae</i> (I)	1	14,85*	6,52*	77,43**	11,23**	0,06 <sup>ns</sup>	1,09 <sup>ns</sup>
Si x I	1	6,69*	9,67**	9,41**	0,11 <sup>ns</sup>	1,68 <sup>ns</sup>	2,41 <sup>ns</sup>
Resíduo	20	-	-	-	-	-	-

<sup>§</sup> graus de liberdade

\*\* Valores significativos a 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> Valores não significativos

**Tabela 4** Desdobramento da interação doses de silício (Si) × inoculação ou não com *Pyricularia oryzae* para a concentração de quatro nutrientes.

Fonte de Variação	de	Concentração							
		Zn mg/kg		Fe mg/kg		Mn mg/kg		S g/Kg	
		-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
Plantas Inoculadas	não	56,43 aA*	31,98 aB	110,10 aA	69,68 bB	303,53 aA	166,65 aB	0,235 aA	0,232 aA
Plantas inoculadas		46,43 bA	30,01 aB	84,81 aA	72,16 aA	185,25 bA	109,51 bB	0,246 aA	0,201 bB
C.V. (%)		9,22		10,93		12,76		10,32	

C.V. coeficiente de variação.

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si nas colunas segundo o teste F ( $P \leq 0,05$ ) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si nas linhas pelo Teste F

**Tabela 5.** Peso da matéria seca da parte aérea (MSPA), da matéria seca de raiz (MSR), da matéria seca total (MST) e razão entre parte aérea/raiz (PA/R) de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si).

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	Razão PA/R
-Si	7,65	2,10	9,75	3,64
+Si	13,00	3,27	16,27	4,34
Valor F	1279*	228,95*	301,5*	91,54 <sup>ns</sup>

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna são significativamente diferentes pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em plantas com sintoma da brusone a fotossíntese é alterada tanto por meio de impedimento bioquímico quanto fotoquímico.

Em plantas infectadas por *P. oryzae*, e supridas com Si, a condutância estomática e a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> foram mantidos, além da proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição crônica e dos fotossistemas contra danos decorrentes da hiperexcitação acentuada.

O estresse oxidativo em plantas infectadas por *P. oryzae* e supridas com Si foi reduzido pela regulação da concentração da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima SOD em associação com a CAT e a APX.

A resistência do arroz à brusone mediada pelo Si pode estar relacionada com o decréscimo nas concentrações de nutrientes, que afetam a nutrição de *P. oryzae* nos tecidos infectados.