

DANIEL AUGUSTO SCHURT

**ANÁLISES MICROSCÓPICAS E BIOQUÍMICAS DA
RESISTÊNCIA DO ARROZ À QUEIMA DAS BAINHAS 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
2010

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

T

S394a
2010

Schurt, Daniel Augusto, 1981-

Análises microscópicas e bioquímicas da resistência do
arroz à queima das bainhas mediada pelo silício / Daniel
Augusto Schurt. – Viçosa, MG, 2010.
viii, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Arroz - Resistência a doenças e pragas. 2. Arroz - Doenças
e pragas - Controle. 3. *Rhizoctonia solani*. 4. Silício. 5. Arroz
- Efeito do silício. 6. Microscopia. 7. Nutrição animal.
8. Bioquímica. 9. Lignina. 10. Pirólise. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

DANIEL AUGUSTO SCHURT

**ANÁLISES MICROSCÓPICAS E BIOQUÍMICAS DA RESISTÊNCIA DO
ARROZ À QUEIMA DAS BAINHAS 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: 29 de abril de 2010.

Prof. José Rogério de Oliveira
(Coorientador)

Dra. Ivanete Tonole da Silva

Pesq. Plínio César Soares

Prof. Sérgio Antonio Fernandes

Prof. Fabrício Ávila Rodrigues
(Orientador)

“Qualquer coisa que você possa fazer, ou sonha que possa fazer, comece a fazê-la. A ousadia tem em si genialidade, força e magia”.
(Goethe, 1749 – 1832).

**Minha Família.
Queridos pais, Odilon e Edite.
E irmão, Leonardo.
Amada Thaís.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em nome do Departamento de Fitopatologia, por possibilitar a realização deste curso.

A FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador Professor Fabrício Ávila Rodrigues pela orientação, pela oportunidade e pelos ensinamentos repassados durante todo o tempo em que trabalhamos juntos, enfim, por toda a amizade e apoio.

Ao Professor José Rogério de Oliveira pela amizade e apoio.

Ao Professor Sergio Antonio Fernandes pelo apoio em química.

À Professora Nilda de Fátima Ferreira Soares pelo apoio.

Ao Professor Jorge Luiz Colodette, apoio na condução dos experimentos de lignina.

À Dra. Claudia Vanetti, pela ajuda na microscopia.

Ao Professor Onkar Dev Dhingra pela amizade, discussões filosóficas e fitopatológicas.

Agradeço aos professores da UFV que contribuíram para a minha formação profissional e pela amizade.

Aos companheiros Rogério Fürst, Ulisses Bremer, Gustavo Guimarães, Paulo Roberto Rocha, Klaus Scheuermann, Valdir Lourenço, Robson Missio e Danilo Menezes.

Aos colegas e amigos do laboratório, Vivian, Dalila, Renata, Wiler, Alessandro, Rodrigo, Washington, Camila, Ivanete, Patrícia, Kelly, Leandro e Lila.

Aos meus estagiários, Ricardo Dutra e Naiara Fernandes.

Aos amigos do departamento Davi, Cristiana, Kida, Henrique, Rodrigo, Dinho, Jaime, Roseli, Rodrigo (difícil citar todos!).

Aos colegas da química, Carolina e Paula em especial a Eduardo e José Pereira pelo auxílio técnico-científico e amizade.

Ao amigo do laboratório de tecnologia de embalagens, Washington Silva.

Ao colega do laboratório de tecnologia em celulose, Mauricio Lano

Ao Secretario, Délio e ao o funcionário Bruno pela ajuda na condução dos experimentos.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DANIEL AUGUSTO SCHURT, filho de Odilon Schurt e Edite Stolf Schurt, nasceu na cidade de Rio dos Cedros, Santa Catarina, em 14 de janeiro de 1981.

Em 2003, graduou-se em Agronomia no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Unidade de Pato Branco – PR.

Em 2006, obteve o título de mestre em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa – MG.

Em abril de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
<i>Capítulo 1</i>	4
Aplicação de produtos visando induzir a resistência do arroz à queima das bainhas	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL & MÉTODOS.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
<i>Capítulo 2</i>	20
Resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, à infecção por <i>Rhizoctonia solani</i> avaliada pelo método da punctura.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL & MÉTODOS.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	31
<i>Capítulo 3</i>	33
Análise Microscópica da Resistência do Arroz à Queima das Bainhas Mediada pelo Silício....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

<i>Capítulo 4</i>	57
Produtos derivados da pirólise de bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, e infectadas por <i>Rhizoctonia solani</i>	57
RESUMO	58
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
3. RESULTADOS & DISCUSSÃO	65
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	72
 <i>Capítulo 5</i>	 76
Concentração de açúcares totais e de lignina nas bainhas de plantas de arroz infectadas por <i>Rhizoctonia solani</i>	76
RESUMO	77
ABSTRACT.....	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAL & MÉTODOS.....	80
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
 CONCLUSÕES GERAIS	 91

RESUMO

SCHURT, Daniel Augusto, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril, 2010.
Análises microscópicas e bioquímicas da resistência do arroz à queima das bainhas mediada pelo silício. Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues. Coorientador: José Rogério de Oliveira e Marta Cristina Corsi de Filippi.

O efeito da aplicação de diferentes produtos, alguns considerados eficientes indutores de resistência, nas bainhas de duas cultivares de arroz visaram reduzir o comprimento relativo das lesões da queima das bainhas. Os resultados desse trabalho indicaram que apenas o Ethephon e o fosfito de potássio foram eficientes em reduzir o comprimento relativo da lesão da queima das bainhas. Os dois produtos a base de silício assim como o acibenzolar-S-metil e a quitosana desacetilada não reduziram o comprimento relativo da lesão da doença. Para mensurar a resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com Si, à infecção por *R. solani* foi utilizado o método da punctura. A resistência das bainhas de plantas de arroz à queima das bainhas deve-se, em parte, a uma maior resistência física ocasionada pela deposição de Si. Ao investigar, a nível microscópico, a resistência do arroz à queima das bainhas potencializada pelo Si verificou-se um menor crescimento superficial de hifas de *R. solani* em bainhas de arroz, menor área necrosada e maior intensidade autofluorescência em cortes transversais de bainhas de arroz. Através da análise de pirólise, elucidou-se o efeito do Si na possível alteração da composição química da lignina da bainha de plantas de arroz quando infectadas por *R. solani*. Nas bainhas infectadas das plantas das duas cultivares, supridas ou não com Si, verificou-se um aumento na relação S/G, exceto para cultivar BR-Irga-409 suprida com Si. Ao analisar o efeito do Si na concentração de açúcares totais e de lignina insolúvel e solúvel em bainhas de plantas de arroz infectadas pelo fungo *R. solani*, constatou-se um aumento na lignificação dos tecidos e a diminuição de açúcares totais.

ABSTRACT

SCHURT, Daniel Augusto, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2010.
Microscopic and biochemical analysis of resistance to rice sheath blight mediated by silicon. Advisor: Fabrício Ávila Rodrigues. Co-Advisers: José Rogério de Oliveira and Marta Cristina Corsi de Filippi.

The effect of different products, some considered to be efficient inducers of resistance, the sheaths of two cultivars of rice aimed at reducing the length of lesions on the sheath blight. The findings indicated that only the Derosal, Ethephon and potassium phosphite were effective in reducing the length of the lesion on the sheath blight. The two products based on silicon as well as acibenzolar-S-methyl and chitosan deacetylated not reduced the relative length of the lesion of the disease. To measure the physical resistance of the sheaths of rice plants, supplied or not with Si, to infection by *R. solani* method was used to puncture. The resistance of the sheaths of rice plants to the sheath blight of the sheaths is due in part to greater physical resistance caused by the deposition of Si Upon investigation, the microscopic level, resistance to rice sheath blight enhanced by Si there A minor superficial hyphal growth of *R. solani* on rice sheaths, smaller necrotic area and higher autofluorescence intensity in transverse sections of sheaths of rice. Through analysis of pyrolysis, elucidated the effect of Si on the possible change of the chemical composition of lignin sheath of rice plants when infected by *R. solani*. Sheaths in infected plants of both cultivars, or not supplied with Si, there was an increase in S/G, except for BR-Irga-409 supplied with Si By analyzing the effect of Si in the concentration of sugars and insoluble and soluble lignin in sheaths of rice plants infected by the fungus *R. solani*, there was an increase in lignification of the tissues and reducing sugars.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma agricultura mais racional visa, entre outras coisas, obtenção de uma maior produtividade por unidade de área e a sanidade do produto. O uso de defensivos químicos, como os fungicidas, difundiram-se enormemente pela sua capacidade de controle, no entanto, apresentam aspectos negativos, como a poluição do ambiente, alterando o complexo biótico da natureza, afetando as plantas, animais e o próprio homem.

Numerosas estratégias têm sido investigadas para o manejo das plantas contra fitopatógenos. Práticas culturais, rotação de cultura, aração e fertilização entre outras, que afetam ecologicamente as comunidades microbianas. Principalmente melhorando o crescimento das comunidades benéficas e induzindo mecanismos de defesa contra microrganismos que causam doenças em plantas.

A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn causa sérias perdas na produção de arroz em países asiáticos (Gangopadhyay & Chakrabarti, 1982). Atualmente, essa doença constitui uma séria ameaça às lavouras de arroz no Brasil devido a utilização da rotação arroz-soja e às condições climáticas favoráveis.

A ausência de resistência genética em grande parte dos cultivares de arroz irrigado faz com que o uso de fungicidas seja a principal medida de controle dessa doença. A fertilização silicatada é uma estratégia de controle que pode ser utilizada no manejo integrado da queima das bainhas. Rodrigues e colaboradores (2001) mostraram que cultivares de arroz susceptíveis e moderadamente susceptíveis a queima das bainhas, após fertilizadas com Si, tiveram o nível de resistência aumentado equiparando-se a cultivares com alto nível de resistência parcial mas não fertilizadas com Si.

Os mecanismos pelos quais o Si confere resistência às plantas ao ataque por *R. solani* permanece em discussão pela comunidade científica. Acredita-se que o aumento da resistência de cultivares de arroz a queima das bainhas está associado com a deposição e polimerização do Si abaixo da cutícula impedindo a penetração dos apressórios e dos colchões de infecção produzidos por *R. solani* na superfície da bainha (Rodrigues *et al.*, 2001). Entretanto, é possível que a resistência do arroz a queima das bainhas conferida pelo Si ocorra através da ativação de algum mecanismo de defesa como já relatado no patossistema arroz-brusone (Rodrigues *et al.*, 2003a, 2004,2005).

Diante das preocupações com o meio ambiente, segurança dos aplicadores de defensivos, saúde pública e custo de aplicação, faz-se necessário encontrar métodos alternativos para o controle dessa doença.

Diante desta perspectiva, objetivou-se com o trabalho verificar:

a) Avaliar o efeito da aplicação de diferentes produtos, alguns considerados eficientes indutores de resistência, nas bainhas de duas cultivares de arroz visando reduzir o comprimento relativo das lesões da queima das bainhas;

b) Mensurar a resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com Si, à infecção por *R. solani* utilizando o método da punctura.

c) Investigar, a nível microscópico, a resistência do arroz à queima das bainhas potencializada pelo Si.

d) Elucidar, através da análise de pirólise, o efeito do Si na possível alteração da composição química da lignina da bainha de plantas de arroz quando infectadas por *R. solani*.

e) Verificar o efeito do Si na concentração de açúcares totais e de lignina insolúvel e solúvel em bainhas de plantas de arroz infectadas pelo fungo *R. solani*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gangopadhyay S, Chakrabarti NK. (1982) Sheath blight of rice. Review of Plant Pathology 61:451-460.

Rodrigues FA, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. Plant Disease 85:827-832.

Rodrigues FÁ, Vale FXR, Korndörfer GH, Datnoff LE, Oliveira AM, Zambolim L. (2003a) Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. Crop Protection 22:23-29.

Rodrigues FÁ, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. Phytopathology 94:177-183.

Rodrigues FÁ, 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.

Capítulo 1

Aplicação de produtos visando induzir a resistência do arroz à queima das
bainhas

RESUMO

Aplicação de produtos visando induzir a resistência do arroz à queima das bainhas

A queima das bainhas, causada por *Rhizoctonia solani*, é uma das principais doenças fúngicas do arroz. Nesse estudo, investigou-se o efeito da aplicação de diferentes produtos em reduzir o comprimento relativo da lesão (CRL) dessa doença. Plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 e Labelle foram crescidas em solução nutritiva e inoculadas com *R. solani* no estágio de máximo perfilhamento. Às 24 horas antes da inoculação, as bainhas das plantas receberam aplicação de soluções de silicato de potássio (SP), Carbon Defense (CD), acibenzolar-S-metil (ASM), fungicida Derosal, quitosana desacetilada (QD), Ethephon (ET) e fosfito de potássio (FP). Plantas cujas bainhas foram pulverizadas com água destilada serviram como testemunha. O efeito desses produtos no crescimento micelial de *R. solani* foi estudado in vitro. O CRL da queima das bainhas nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409 foi menor com a aplicação do FP em relação aos demais tratamentos, exceto o Derosal. Não houve diferença dos tratamentos ET, ASM, SP, CD e QD em relação à testemunha para a cultivar Labelle. A aplicação do ET e do Derosal reduziram em 41 e 86%, respectivamente, o CRL da queima das bainhas em relação à testemunha da cultivar Labelle. Para a cultivar BR-Irga 409, os tratamentos ASM, FP, SP, CD e QD não diferiram da testemunha. O CRL da queima das bainhas foi menor para as cultivares BR-Irga 409 e Labelle, respectivamente, com aplicação do FP e do ET. O crescimento micelial de *R. solani* foi inibido pelo ET, ASM, FP, SP, CD, Derosal e QD em comparação ao tratamento controle (água). O crescimento micelial de *R. solani* foi mais reduzido com o FP, seguido do SP, CD e ASM. O Derosal foi o tratamento que mais inibiu o crescimento de *R. solani*. As concentrações de Si nas bainhas das plantas das cultivares BR-Irga 409 e Labelle foram de 1; 2,2 e 1,2% e de 0,8; 0,7 e 0,8%, respectivamente, para os tratamentos testemunha, SP e CD, mas sem diferença significativa entre esses três tratamentos, independente da cultivar. Conclui-se que apenas o ET e o FP foram eficientes em reduzir o CRL da queima das bainhas. Os produtos SP e CD, fontes de silício solúvel, e o ASM e a QD não reduziram o CRL da

queima das bainhas ao contrário da eficiência deles em decrescer a intensidade de doenças em outras culturas conforme reportado na literatura.

Palavras-chave: indutores, *Oryza sativa*, resistência induzida, *Rhizoctonia solani*, silicato.

ABSTRACT

Application of products aiming to induce rice resistance to sheath blight

Sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani*, is one of the most important fungal diseases on rice. This study aimed to determine the effect of products application to decrease the relative lesion extension (RLE) of sheath blight. Plants from cultivars BR-Irga 409 and Labelle were grown in nutrient solution and inoculated with *R. solani* at the maximum tillering stage. At 24 hours before inoculation, the sheaths of plants received the application of solutions of potassium silicate (PS), carbon defense (CD), acibenzolar-S-methyl (ASM), fungicide Derosal, deacetylated chitosan (DC), Ethephon (ET), and potassium phosphite (PP). Sheaths from plants sprayed with water served as the control treatment. The effect of these products on *R. solani* mycelia growth was also studied *in vitro*. The RLE of sheath blight on sheaths of plants from cultivar BR-Irga 409 was reduced with the application of PP compared to the other treatments, except the Derosal. For Labelle, there was no difference of the treatments ET, ASM, PS, CD, and DC to the control. The application of ET and Derosal reduced in 41 and 86%, respectively, the RLE in comparison to the control. For the cultivar BR-Irga 409, the treatments ASM, PP, PS, CD, and DC were not different from the control. The RLE of sheath blight was lower for BR-Irga 409 and Labelle, respectively, for the application of PP and ET. Mycelia growth of *R. solani* was inhibited by ET, ASM, PP, PS, CD, Derosal, and DC in comparison to the control (water). Mycelia growth of *R. solani* was more reduced with PP followed by PS, CD, and ASM. Derosal was the treatment that most inhibited *R. solani* growth. Silicon concentrations on sheaths of plants from cultivars BR-Irga 409 and Labelle were 1, 2.2, and 1.2% and 0.8, 0.7, and 0.8%, respectively, for the control, PS, and CD, but without difference among them regardless of the cultivars. It can be concluded that only the ET and the PP were efficient to reduce the RLE of sheath blight. The products PS and CD, sources of soluble silicon, and the ASM and the DC did not reduce the RLE of sheath blight in contrast to their efficiency in reducing the intensity of diseases on other crops as reported in the literature.

Keywords: induced resistance, inducers, *Oryza sativa*, *Rhizoctonia solani*, silicates.

1. INTRODUÇÃO

A queima das bainhas, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn (*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk) (Hashiba & Kobayashi, 1996), é uma das principais doenças fúngicas do arroz [*Oryza sativa* L.], sendo superada apenas pela brusone (*Pyricularia grisea*) (Ou, 1985). Essa doença causa sérios prejuízos na produção do arroz cultivado nos estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins devido à rotação com a soja e também às condições climáticas favoráveis para a ocorrência de epidemias severas. Além disso, a formação de um grande número de escleródios dificulta o controle da doença (Lee & Rush, 1983). As plantas tornam-se infectadas quando os escleródios entram em contato com a bainha, germinam e o micélio forma inúmeras almofadas de infecção sobre os tecidos suscetíveis da bainha (Matsuura, 1986). Nas bainhas, observam-se lesões circulares e/ou arredondadas de coloração acinzentada com bordas marrom-escura (Ou, 1985). Ao coalescerem, as lesões causam a seca parcial ou total das bainhas e das folhas, o acamamento das plantas, uma maior porcentagem de glumas vazias e uma redução no número de perfilhos (Rush & Lee, 1992).

O uso de fungicidas é a principal medida de controle da queima das bainhas, pois as cultivares de arroz irrigado disponíveis aos rizicultores são suscetíveis (Li *et al.*, 1995). Diante das preocupações com o meio ambiente, segurança dos aplicadores de defensivos, saúde pública e custo de aplicação, faz-se necessário encontrar métodos alternativos para o controle dessa doença. A aplicação de silício (Si), seja via foliar ou via solo, tem reduzido a intensidade de inúmeras doenças fúngicas e bacterianas em várias culturas de importância comercial (Datnoff *et al.*, 2007). Em arroz, a aplicação foliar de silicato de potássio reduziu a severidade da mancha parda e o número de lesões em 37 e 47%, respectivamente, mas a redução desses dois componentes de resistência foi maior quando as plantas absorveram o Si pelas raízes (Rezende *et al.*, 2009).

A ativação de mecanismos de defesa em plantas que afetam o processo infeccioso de vários patógenos é sinalizada pelos hormônios ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (Kachroo & Kachroo, 2007). A aplicação do benzotiadiazole (BTH), um análogo do AS, a partir das 24 horas antes da inoculação das bainhas das plantas de

arroz com *R. solani* reduziu a severidade da doença (Rohilla *et al.*, 2001). A aplicação do BTH também aumentou a resistência das plantas de arroz à queima foliar causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* por três dias, resistência essa confirmada pela maior concentração de compostos fenólicos e atividade de quitinases e β -1,3-glucanases (Babu *et al.*, 2003).

O crescimento micelial de *Pyricularia grisea* e o número de conídios produzidos por esse fungo nas lesões foram negativamente afetados pela aplicação de quitosana (Rabea *et al.*, 2005). Plantas de trigo pulverizadas com quitosana hidrolisada apresentaram aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e peroxidases e, conseqüentemente, tornaram-se mais resistentes ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (Mitchell *et al.*, 1994). A severidade da requeima (*Phytophthora infestans*) em tubérculos de batata também foi reduzida pela aplicação de quitosana devido ao aumento na atividade das enzimas quitinases e β -1,3-glucanases (Vasyukova *et al.*, 2001).

O etileno também tem uma participação importante na resistência de algumas espécies de plantas à patógenos. A ativação de genes responsivos ao etileno, a exemplo do *OsBIERF*, em arroz aumentou a resistência das plantas à brusone (Cao *et al.*, 2006). Plantas mutantes de soja deficientes na produção de etileno foram mais suscetíveis ao crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, do que as plantas responsivas à esse hormônio (Weingart *et al.*, 2001). Videiras pulverizadas com etileno apresentaram frutos com maior resistência ao mofo cinzento (Elad, 1993). Contrariamente, em algodão, o etileno foi responsável pela epinastia das folhas e desfolha das plantas infectadas por *Verticillium dahliae* (Tzeng *et al.*, 1985).

A aplicação de fosfito também tem se mostrado promissora no controle de algumas doenças em plantas de interesse comercial. Houve menor incidência do mofo azul, causado por *Penicillium expansum*, em maçãs pulverizadas com fosfito de potássio (Blum *et al.*, 2007). A aplicação desse produto em mistura com o cloreto de cálcio reduziu a incidência de podridões (*P. expansum*) em maçãs frigoconservadas (Brackmann *et al.*, 2004). Plantas de pimenta pulverizadas com solução de fosfito e fosfato foram mais resistentes a murcha causada por *Phytophthora capsici* (Foster *et al.*, 1998). O fosfito de potássio inibiu a germinação dos conídios de *Verticillium dahliae* (Ribeiro Júnior *et al.*, 2006) e o crescimento micelial da raça 4 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Davis *et al.*, 1994).

Objetivou-se com o trabalho verificar o efeito da aplicação de diferentes produtos, alguns considerados eficientes indutores de resistência, nas bainhas de duas cultivares de arroz visando reduzir o comprimento relativo das lesões da queima das bainhas.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Crescimento das plantas

Sementes de arroz das cultivares BR-Irga 409 e Labelle, suscetíveis à *R. solani*, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 10% (vol/vol) por 2 min, lavadas em água destilada por 3 min, e colocadas para germinar em papel germiteste umedecido. Os rolos de papel germiteste foram colocados em câmara de germinação a 25°C por 6 dias. As plântulas foram crescidas em vasos plásticos com solução nutritiva utilizando metade da concentração por sete dias. Após esse período, as plantas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 litros de solução nutritiva modificada de Hoagland & Arnon (1950) até os 60 dias após o transplântio (estádio de máximo perfilhamento). Essa solução nutritiva foi constituída de: 1,0 mM KNO₃; 0,25 mM NH₄H₂PO₄; 0,1 mM NH₄Cl; 0,5 mM MgSO₄·7H₂O; 1,0 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O; 0,30 µM CuSO₄·5H₂O; 0,33 µM ZnSO₄·7H₂O; 11,5 µM H₃BO₃; 3,5 µM MnCl₂·4H₂O; 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 25 µM FeSO₄·7H₂O; e 25 µM EDTA bisódico. A solução nutritiva, sem aeração, foi trocada a cada quatro dias. O pH da solução foi monitorado diariamente e mantido em 5,5 utilizando-se soluções 1 M de NaOH ou HCl quando necessário.

2.2. Aplicação dos produtos

As bainhas das plantas das duas cultivares foram pulverizadas com as soluções de silicato de potássio (SP) (FertiSil[®], PQ Silicas Brazil Ltda, São Paulo, SP) na dose de 10 g/L; Carbon Defense (CD) (Floratine Bioscience[®], USA) na dose de 2 mL/L, acibenzolar-S-metil (ASM) (130 mg i.a./L); fungicida Derosal[®] (Carbendazim 500 mg i.a./L); quitosana desacetilada (QD) a 85% (500 mg/L); Ethephon[®] (ET) (1,5 mL/L) e fosfito de potássio (FP) (Hortifos PK[®], 27% de P₂O₅ e 27% de K₂O, Agrichem do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP) na dose de 6 mL/L. O pH das soluções de SP e de FP foram ajustadas para 6,0 utilizando-se, respectivamente, soluções 1 M de HCl e NaOH. As

bainhas das plantas das duas cultivares pulverizadas com água destilada representaram o tratamento controle.

2.3. Produção do inoculo, inoculações e avaliações

As bainhas das plantas foram inoculadas com *R. solani* às 24 horas após a aplicação dos produtos mencionados acima. Utilizou-se o isolado de *R. solani* CNPAF Rs-1 (AG-1 IA) fornecido pelo Dr. Anne Sitarama Prabhu (CNPAF). Micélio e escleródios do fungo foram preservados em papel de filtro. Após o crescimento do fungo em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), discos do meio contendo micélio foram retirados e distribuídos em novas placas de Petri contendo BDA. Na superfície do meio de cultura contido em cada placa de Petri, foram colocados pedaços de palito de dente, de aproximadamente 1 cm de comprimento, que serviram como suporte para o crescimento do fungo. Os pedaços de palito de dente, foram previamente lavados em água quente para remover possíveis substâncias tóxicas, foram colocados em frascos contendo BDA e autoclavados por 20 min (Rodrigues et al., 2001). As placas contendo micélio fúngico crescendo sobre e também no interior dos palitos, foram transferidas para câmara de crescimento (25°C, fotoperíodo de 12 h luz/escuro) onde permaneceram por 5 dias. A segunda bainha do perfilho principal de cada planta foi inoculada colocando, com auxílio de uma pinça estéril, um pedaço de palito colonizado pelo fungo. As bainhas inoculadas foram amarradas aos perfilhos das plantas com fitilhos. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$. Plantas cujas bainhas foram pulverizadas com ET foram colocadas em uma câmara de nevoeiro diferente daquela onde se encontravam as plantas que receberam os demais tratamentos. Avaliou-se o comprimento da lesão da queima das bainhas em cada bainha inoculada às 96 horas após a inoculação das plantas com auxílio de um paquímetro digital. O comprimento relativo da lesão (CRL) foi calculado dividindo o comprimento da lesão (em cm) pelo comprimento da bainha (em cm) x 100.

2.4. Determinação de Silício

Após o término do experimento, as bainhas das plantas das repetições dos tratamentos testemunha, SP e CD foram coletadas, lavadas, secas em estufa a 65°C até atingirem peso constante e moídas em moinho tipo Wiley para determinação da concentração de Si (Korndörfer *et al.*, 2004).

2.5. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 x 2 com cinco repetições. Os fatores estudados foram: pulverização das plantas com os oito produtos, incluindo a testemunha, e duas cultivares de arroz. Cada repetição foi constituída por um vaso plástico contendo duas plantas de arroz. Os dados do CRL da queima das bainhas e da concentração de Si na bainha foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.0 (Institute Inc., Cary, NC).

2.6. Testes *in vitro*

Foram testados, *in vitro*, os produtos utilizados na pulverização das bainhas para a inibição do crescimento micelial de *R. solani*. Esses produtos foram incorporados ao meio BDA, nas mesmas doses descritas acima, e no centro de cada placa de Petri foi colocado um disco de micélio (1 cm de diâmetro) do fungo. O crescimento micelial, em cm², foi medido às 48 horas. Placas contendo água deionizada esterilizada adicionada ao meio de cultura serviram como testemunha. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos (descritos acima) e cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo ($P = 0,003$) dos fatores produtos e cultivares, bem como da interação desses fatores para o CRL da queima das bainhas. Nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409, o CRL foi significativamente menor ($P < 0,05$) com a

aplicação do FP em relação aos demais tratamentos, exceto para o Derosal (Tabela 1). Para o CRL nas bainhas das plantas da cultivar Labelle, não houve diferença significativa ($P = 0,05$) dos tratamentos ASM, FP, SP, CD e QD em relação à testemunha (Tabela 1). Porém, houve redução significativa de 41 e 86%, respectivamente, no CRL com a aplicação do ET e do Derosal em relação à testemunha (Tabela 1). Não houve diferença significativa ($P = 0,05$) entre os tratamentos ET, FP e QD para a cultivar Labelle. Sabe-se que para ocorrer redução nos sintomas de uma doença, o etileno deve ser aplicado antes que as plantas entrem em contato com o patógeno, considerando que a doença pode se desenvolver mais rapidamente caso esse hormônio seja aplicado após ocorrer infecção (Abeles *et al.*, 1992). Assim, o tempo de exposição da planta ao etileno estimulará ou reduzirá a resistência à determinados patógenos (van Loon *et al.*, 2006). As plantas de arroz, principalmente da cultivar Labelle, que receberam a aplicação do ET, apresentaram-se mais resistentes à queima das bainhas com base nos valores do CRL obtidos. De acordo com Agrawal *et al.*, (2001), o etileno, gerado a partir do Ethephon na concentração de 0,1 a 2,5 mmol/L, induziu os genes *PR1*, *PR10* e *PR5*, produtores de proteínas relacionadas com a patogênese, em arroz. Hoffman *et al.* (1999) observaram que plantas de soja deficientes na percepção do etileno apresentaram o mesmo nível de suscetibilidade à *R. solani* do que as plantas do tipo selvagem. Plantas de couve-flor apresentaram redução na severidade do míldio, causado por *Peronospora parasitica*, quando pulverizadas com sais de fosfito na concentração de 7 mL/L (Bécot *et al.*, 2000). Na concentração de 10 mL/L, esse produto promoveu uma resistência induzida local, mas não de natureza sistêmica, nas plantas de couve-flor ao míldio, com menor atividade da enzima β -1,3 glucanase. Sais de fosfito na concentração de 7 mL/L reduziram a germinação dos esporângios de *P. parasitica* em até 53% (Bécot *et al.*, 2000).

Não houve diferença significativa entre as cultivares BR-Irga 409 e Labelle para os tratamentos ASM, SP, CD, QD e testemunha (Tabela 1). A ineficiência do ASM em reduzir o CRL da queima das bainhas, independente da cultivar de arroz, pode estar relacionado com a dose utilizada ou até mesmo com o tempo necessário para que as plantas dessas cultivares expressarem a resistência sistêmica adquirida. De acordo com Rohilla *et al.* (2001), o ASM foi mais eficiente em reduzir a severidade da queima das bainhas em arroz quanto mais cedo as plantas fossem expostas à esse produto antes da inoculação. Aplicações de doses altas do ASM podem ativar rapidamente a resistência de uma determinada espécie de planta (van Hulten *et al.*, 2006), ao contrário de doses menores desse indutor (Conrath *et al.*, 2006).

Embora a quitosana seja capaz de induzir respostas de defesa em diferentes espécies de plantas à vários patógenos (Vander *et al.*, 1998), no presente trabalho observou-se ineficiência desse indutor em reduzir o CRL da queima das bainhas, o que pode ser explicado pela dose utilizada e/ou pelo grau de deacetilação do produto. Sabe-se que o grau de polimerização, o nível de deacetilação e a distribuição das cargas no polímero afetam a atividade biológica da quitosana (Muzzarelli, 1996). Em arroz, o pré-tratamento de sementes e a pulverização das plantas com quitosana e quitosana hidrolisada nas concentrações de 100 a 1000 mg/L reduziram a severidade da brusone (Rodríguez *et al.*, 2007). A atividade da FAL foi menor nas plantas de arroz pulverizadas com quitosana do que nas plantas que receberam a aplicação de quitosana hidrolisada (Rodríguez *et al.*, 2007). De acordo com Lin *et al.* (2005), quanto menor o peso molecular da quitosana pulverizada nas plantas de arroz, maior será a redução nos sintomas da brusone.

Com a aplicação do fungicida Derosal, o CRL foi significativamente menor ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos para as duas cultivares de arroz. Esse fungicida é eficiente no controle da queima das bainhas em condições de campo (Rush & Lee, 1992). Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as duas cultivares ocorreu apenas com a aplicação do ET e do FP (Tabela 1). O CRL foi significativamente menor ($P < 0,05$) com a aplicação do FP para BR-Irga 409 enquanto que para Labelle, o CRL foi menor com a aplicação do ET (Tabela 1), resposta essa explicada, possivelmente, por serem do tipo *japônica* e *indica*.

O crescimento micelial de *R. solani* foi significativamente ($P < 0,05$) inibido com a incorporação dos produtos ET, ASM, FP, SP, CD, D e QD ao meio de cultura em comparação com o tratamento controle (Fig. 1). O FP foi o que mais reduziu o crescimento micelial de *R. solani*, seguido do SP e ASM. O Derosal inibiu completamente o crescimento micelial de *R. solani*, o qual diferiu significativamente ($P < 0,05$) dos demais tratamentos (Fig. 1). Sabe-se que o BTH análogo do ASM, tem efeito fungitóxico reduzido à *R. solani* (Rohilla *et al.*, 2001), porém não existe informação na literatura sobre o efeito dos demais produtos testados no crescimento micelial desse fungo em testes *in vitro*.

As concentrações de Si nas bainhas das plantas das cultivares BR-Irga e Labelle foram de 1; 2,2 e 1,2% e de 0,8; 0,7 e 0,8%, respectivamente, para os tratamentos testemunha, SP e CD, mas sem diferença significativa ($P = 0,05$) entre esses três tratamentos, independente da cultivar. Não houve diferença significativa ($P = 0,05$) entre as duas cultivares para a concentração de Si na bainha. Sabe-se que as espécies de

plantas diferem quanto à capacidade em absorver o Si do solo e translocá-lo, de forma eficiente, para a parte aérea (Mitani & Ma, 2005). O arroz, a cana-de-açúcar e outras gramíneas, reconhecidas como acumuladoras de Si, chegam a apresentar até 5% de Si na matéria seca da parte aérea (Datnoff *et al.*, 2007). A aplicação do SP e do CD nas bainhas das plantas de arroz não resultou em menores valores do CRL, indicando uma ineficiência das plantas em absorver o Si solúvel contido nesses dois produtos e depositá-lo nos tecidos da bainha de forma a afetar a infecção por *R. solani*. Salienta-se, contudo, que a resposta poderia ser diferente caso esses produtos tivessem sido fornecidos via raiz. De acordo com Rezende *et al.* (2009), a concentração foliar de Si foi maior quando as plantas de arroz absorveram esse elemento pelas raízes, ao contrário, do que foi observado quando foi realizada a aplicação foliar do silicato de potássio, que garantiu uma redução significativa na severidade da mancha parda. Rodrigues *et al.* (2001) obtiveram redução na intensidade da queima das bainhas em plantas de cultivares de arroz suscetíveis e moderadamente resistentes crescidas em solo contendo silicato de cálcio para o mesmo nível observado em cultivares com um alto nível de resistência parcial, porém não supridas com Si.

Os resultados desse trabalho indicaram que apenas o ET e o FP foram eficientes em reduzir o CRL da queima das bainhas, possivelmente através da indução de mecanismo(s) de defesa. Os dois produtos a base de Si assim como o ASM e a QD não reduziram o CRL da doença ao contrário da eficiência deles em decrescer a intensidade de doenças em outras culturas conforme reportado na literatura.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit JRM (1992) Ethylene in Plant Biology, Elsevier, Academic Press. 2nd Ed., 414 p.

Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS (2001) Differential induction of three pathogenesis-related genes, PR10, PR1b and PR5 by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Journal of Plant Physiology 158:133-137.

Babu RM, Sajeena A, Vijayasamundeeswari A, Sreedhar A, Vidhyasekeran P, Reddy MS (2003) Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. Annals of Applied Biology 43:333-340.

- Bécot S, Pajot E, Le Corre D, Monot C, Silué D (2000) Phytogard® (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection* 9:417-425.
- Blum LEB, Amarante CVT, Dezanet A, Lima EB, Neto PH, Ávila RD, Siega V (2007) Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29:265-268.
- Brackman A, Giehl RFH, Sestari I, Steffens CA (2004) Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs Fuji durante o armazenamento refrigerado. *Ciência Rural* 34:1039-1042.
- Cao Y, Song F, Goodman RM, Zheng Z (2006) Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. *Journal of Plant Physiology* 163:1167-1178.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19:1062-1071.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW (2007) Silicon and Plant Nutrition. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds.) *Mineral nutrition and plant disease*. Saint Paul MN. APS Press, pp. 233-246.
- Davis AJ, Say M, Snow AJ, Grant BR (1994) Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* to phosphonate. *Plant Pathology* 43:200-205.
- Elad Y (1993) Regulators of ethylene biosynthesis or activity as a tool for reducing susceptibility of host plant tissues to infection by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99:105-113.
- Foster H, Adascaveg JE, Kim DH, Sthangelline ME (1998) Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Disease* 82:1165-1171.
- Hashiba T, Kobayashi T (1996) Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: Sneh B, Jabahi-Hare S, Neate S, Dijst G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 331 p.
- Hoagland R, Arnon I (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Circular of the California Agricultural Experiment Station* 347:1-32.

- Hoffman T, Scott-Schmidt J, Zheng X, Bent AF (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* 119:935-949.
- Kachroo A, Kachroo P (2007) Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. *Genetic Engineering* 28:55-83.
- 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, 24 pp.
- Lee FN, Rush MC (1983) Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease* 67:829-832.
- Li Z, Pinson SRM, Marchetti MA, Stansel JW, Park WD (1995) Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theoretical and Applied Genetics* 91:382-388.
- Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W (2005) Hydrogen peroxide mediates defense responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Journal of Plant Physiology* 162:937-44.
- Matsuura K (1986) Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. *Phytopathology* 76:811-814.
- Mitani N, Ma JF (2005) Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany* 56:1255-1261.
- Mitchell H, Hall J, Barber M (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* 104:551-556.
- Muzzarelli RAA (1996) Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers* 29:309-316.
- Ou SH (1985) *Rice Diseases*. 2nd Ed., Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 380 p.
- Rabea EI, Badawy ME, Rogge TM, Stevens CV, Höfte M, Steurbaut W, Smagghe G (2005) Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Management Science* 61:951-960.
- Rezende DC, Rodrigues FÁ, Carré-Missio V, Schurt DA, Kawamura IK, Korndörfer GH (2009) Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. *Australasian Plant Pathology* 38:67-73.

- Ribeiro Júnior PM, Resende MLV, Pereira RB, Cavalcanti FR, Amaral DR, Pádua MA (2006) Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). *Ciência e Agrotecnologia* 30:629-636.
- Rodrigues FA, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease* 85:827-832.
- Rodríguez AT, Ramírez MA, Cárdenas RM, Hernández AN, Velázquez MG, Bautista S (2007) Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89:206-215.
- Rohilla R, Singh US, Singh RL (2001) Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest Management Science* 58:63-69.
- Rush MC, Lee FN (1992) Sheath blight. In: Webster RK, Gunnell PS (Eds.). *Compendium of Rice Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 22-23.
- Tzeng DD, Devay JE (1985) Physiological responses of *Gossypium hirsutum* L. to infection by defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiological Plant Pathology* 26:57-72.
- van Hulten M, Pelsler M, van Loon LC, Pieterse CM, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5602-5607.
- van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11:184-191.
- Vander P, Varum KM, Domard A, Eddine EL, Gueddari N, Moerschbacher BM (1998) Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology* 118:1353-1359.
- Vasyukova NI, Zinoveva SV, Iiinskaya LI, Perekhod EA, Chalenko GI, Gerasimova NG, Ilina AV, Varlamov VP, Ozeretskovskaya OL (2001) Modulation of plant resistance to disease by water soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37:103-109.
- Weingart H, Ullrich H, Geider K, Völksch B (2001) The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. *Phytopathology* 91:511-518.

Tabela 1. Comprimento relativo da lesão (CRL) da queima das bainhas nas bainhas das plantas de duas cultivares de arroz que receberam a aplicação de diferentes produtos visando induzir resistência.

Tratamentos	CRL (%)	
	BR-Irga 409	Labelle
Água destilada (testemunha)	35,7 aA	29,6 aA
Ethephon	25,1 aA	17,4 bB
Acibenzolar-S-metil	23,1 aA	29,3 aA
Fosfito de potássio	13,5 bA	23,2 abB
Silicato de potássio	24,8 aA	29,7 aA
Carbon Defense	30,8 aA	29,2 aA
Quitosana desacetilada	30,1 aA	28,4 abA
Derosal	1,1 cA	4,1 cA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

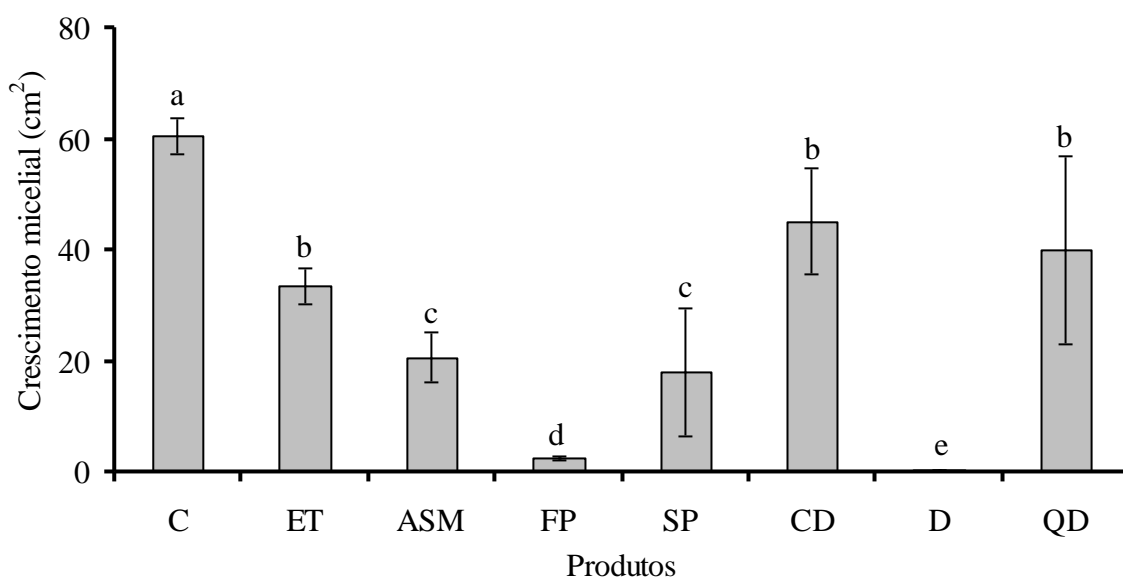


Figura 1. Efeito de diferentes produtos, avaliados para induzir resistência do arroz à queima das bainhas, no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em meio de cultura. A inibição do crescimento micelial foi avaliada às 48 horas após a adição dos produtos ao meio de cultura. C = água destilada esterilizada (controle); ET = Ethephon; ASM = Acibenzolar-S-Metil; FP = Fosfito de Potássio; SP = Silicato de Potássio; CD = Carbon Defense; D = Derosal; QD = Quitosana Desacetilada.

Capítulo 2

Resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, à infecção por *Rhizoctonia solani* avaliada pelo método da punctura

RESUMO

Resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, à infecção por *Rhizoctonia solani* avaliada pelo método da punctura

As regiões orizícolas, principalmente no Centro-Oeste do Brasil, sofrem sérias perdas econômicas provocadas pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, o agente causal da queima das bainhas. O silício (Si) aumenta a resistência do arroz contra doenças fúngicas. O mesmo é depositado na parede celular, abaixo da cutícula formando uma dupla camada de sílica-cutícula. Com esse trabalho objetivou-se, mensurar a resistência física pelo método da punctura em bainhas de arroz supridas (+Si) ou não (-Si) com silício, infectadas ou não com *R. solani*. A resistência física para a agulha atravessar às 48 e 72 hai da bainha das duas cultivares foi maior quando as plantas foram tratadas com Si. Às 96 hai, não houve diferença na força para atravessar as bainhas das duas cultivares, supridas com ou sem Si. Neste estudo estabelece evidência direta que plantas supridas com Si respondem a infecção por *R. solani*, através de mecanismos que fortalecem a parede das células.

Palavras chaves: Controle de doenças, nutrição mineral, queima das bainhas, *Oryza sativa* L.

ABSTRACT

Physical resistance of the sheaths of rice plants, supplied with or without silicon, to infection by *Rhizoctonia solani* evaluated by puncture

The rice regions, mainly in the Midwest of Brazil, suffer serious economic losses caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, the causal agent of the Sheath blight. Silicon (Si) increases the resistance of rice against fungal diseases. The same is deposited in the cell wall beneath the cuticle to form a double layer of silica-cuticle. With this work our aim was to measure the physical resistance by the method of puncture in sheaths of rice supplied (+Si) or not (-Si) with silicon, infected or not with *R. solani*. The physical stamina to go through the needle at 48 and 72 hai of the sheath of both cultivars was higher when plants were treated with Si. At 96 hai, there was no difference in strength to go through the sheaths of two cultivars, supplied with or without Si. This study provides direct evidence that plants supplied with Si respond to infection by *R. solani*, through mechanisms that strengthen the cell walls.

Keywords: Control of diseases, nutrition, sheath blight, *Oryza sativa* L.

1. INTRODUÇÃO

A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn grupo de anastomose 1 IA (Ogoshi, 1987), causa sérias perdas econômicas em várias regiões orizícolas, principalmente na região Centro-Oeste do Brasil. Em condições ambientais favoráveis, as lesões ao coalescerem ocasionam a seca das folhas, das bainhas e o acamamento das plantas com redução drástica na produção (Ou, 1985). O controle da queima das bainhas é realizado principalmente com a aplicação de fungicidas (Groth *et al.*, 1990; Rush & Lee 1992), pois todas as cultivares disponíveis aos rizicultores não apresentam resistência à essa doença (Li *et al.*, 1995).

O silício (Si) aumenta a resistência do arroz contra diversas doenças fúngicas tais como a brusone, mancha parda, queima foliar e escaldadura (Datnoff *et al.*, 2007). Com ênfase a queima das bainhas, Rodrigues *et al.* (2001) demonstraram que várias cultivares de arroz supridas com Si apresentaram redução na severidade da doença. Algumas doenças economicamente importantes em centeio, milho, pepino, uva, cevada, morando e trigo também têm suas intensidades reduzidas quando as plantas são supridas com Si (Datnoff *et al.*, 2007).

As plantas de arroz podem acumular o Si em até 10% do peso seco, o que é superior a concentração de alguns macronutrientes como o nitrogênio, o fósforo e o potássio (Ma & Takahashi, 2002). O Si é absorvido pelas raízes das plantas na forma de ácido monossilícico, sendo transportado via fluxo da transpiração e depositado na folha na forma de sílica (Sangster *et al.*, 2001). Duas proteínas produzidas pelos genes *Lsi1* e *Lsi2* são responsáveis pelo transporte ativo do ácido monossilícico na exoderme e na endoderme das raízes laterais de plantas de arroz (Ma *et al.*, 2006, 2007a). Nas folhas, a proteína produzida pelo gene *Lsi6* é responsável pela translocação do ácido monossilícico do xilema para o interior das células do parênquima (Yamaji *et al.*, 2008). O Si é depositado na parede celular abaixo da cutícula formando uma dupla camada de sílica-cutícula (Yoshida *et al.*, 1962). A hipótese comumente aceita é que essa dupla camada sílica-cutícula evita ou atrasa a penetração pelo fungo *Pyricularia grisea*, agente causal da brusone, nas folhas de arroz (Kim *et al.*, 2002). A redução do número de lesões de brusone em folhas de arroz de plantas supridas com Si foi atribuída a fortificação da epiderme pela deposição e polimerização do ácido monossilícico (Kim *et*

al., 2002). Yoshida *et al.* (1962) ao estudarem a natureza química do Si em plantas de arroz, reportaram que 90% desse elemento encontrava-se na forma de sílica gel e somente 0,5% na forma de ácido monossilícico. Sabe-se que o ácido monossilícico polimerizado na parede celular é capaz de preencher os espaços deixados pelos polímeros de celulose, formando uma matriz sílica-celulose. No caso da sílica gel, essa encontra-se localizada principalmente na parede das células da epiderme, dos vasos do xilema e floema e também no esclerênquima.

Alguns pesquisadores relataram uma diminuição da resistência da punctura na epiderme de plantas suscetíveis de batata e *Berberis* spp. ao serem infectadas, respectivamente, por *Pythium debaryanum* e *Puccinia graminis* (Hawkins & Harvey, 1919; Melander & Craigie, 1927). Ito & Sakamoto (1939) mensuraram a resistência à punctura de folhas de arroz supridas com Si e inoculadas com *P. grisea* utilizando uma balança de torção com uma fina agulha de metal (30 µm diâmetro) que perfurava o tecido e media a força utilizada para tal. As plantas supridas com Si apresentaram maior resistência à punctura em relação às plantas não supridas com esse elemento. Experimentos utilizando silicatos foram conduzidos entre 1950 a 1970, porém as pesquisas para entender o mecanismo pelo qual o Si conferia a resistência do arroz à brusone declinou, possivelmente, pela disponibilidade de fungicidas cada vez mais eficientes e o desenvolvimento de cultivares resistentes (Ishiguro, 2001).

Objetivo-se com esse trabalho mensurar a resistência física das bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com Si, à infecção por *R. solani* utilizando o método da punctura.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Crescimento das plantas

As sementes de arroz das cultivares Labelle (*japônica*) e BR-Irga 409 (*índica*) foram germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidos a 25°C. Após a germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em solução nutritiva com a metade da concentração, sem adição de Si. As plântulas foram crescidas em vasos contendo 0,5 L de solução nutritiva modificada de Hoagland & Arnon (1950), a qual era composta dos seguintes nutrientes: 1 mol.L⁻¹ KNO₃; 0,25 mol.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mol.L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mol.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 mol.L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,3 mmol.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 mmol.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 mmol.L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 mmol.L⁻¹ MnCl₃.4H₂O; 0,014

mmol.L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 mmol.L⁻¹ Na₂EDTA e 25 mmol.L⁻¹ FeSO₃. Para o preparo da solução nutritiva, utilizou-se 1 mL de cada nutriente para cada 9 mL de água deionizada. Plantas crescidas em solução nutritiva sem a adição de ácido monossilícico serviram como controle. As plantas foram supridas com Si, adicionando-se o ácido monossilícico à solução nutritiva na concentração de 2 mmol/L. O ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio (4,5 mL/L de água) através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite-120, Fluka) (Ma *et al.*, 2002). A solução nutritiva foi trocada a cada 4 dias e o pH foi verificado a cada dois dias e mantido na faixa de 5,5 a 6. As plantas foram crescidas em solução nutritiva com a concentração indicada dos 2 aos 30 dias após o transplante, posteriormente, a concentração foi aumentada em 1,5 vezes até o máximo perfilhamento (60 dias após o transplante).

2.2. Produção do inoculo, inoculações e avaliações

As plantas foram inoculadas com o isolado *Rs-1* de *R. solani* (grupo de anastomose AG1-1A), cedido pelo Dr. Anne Sitarama Prabhu da Embrapa Arroz e Feijão, no estágio de máximo perfilhamento. O fungo foi crescido em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e discos do meio contendo micélio do fungo foram retirados e distribuídos em novas placas de Petri contendo BDA, o qual continha na superfície do meio, pedaços de palito de dente de 1 cm de comprimento. Os palitos de dente foram lavados em água quente para a retirada das possíveis substâncias tóxicas. Posteriormente, os palitos de dente foram misturados ao BDA e esterilizados em autoclave por 20 min antes de serem transferidos para placas de Petri. Os pedaços de palito com BDA serviram como suporte para o crescimento do fungo. As placas foram transferidas para câmara de crescimento (25°C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro) onde permaneceram por 5 dias. Pedaços de palitos de dente contendo o fungo foram transferidos, com o auxílio de uma pinça estéril, para a segunda bainha do perfilho principal das plantas das repetições de cada tratamento. A bainha foi amarrada no colmo da planta com um fitilho para garantir o contato com o fungo. Plantas cujas bainhas receberam apenas palito de dente sem o fungo serviram como controle. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25°C e umidade relativa de 95%. Avaliou-se com auxílio de um paquímetro digital o comprimento da lesão da queima das bainhas em cada bainha inoculada às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai). Os dados obtidos foram

utilizados para calcular o comprimento relativo da lesão (CRL) de acordo com a seguinte fórmula: comprimento da lesão na bainha (mm) / comprimento total da bainha (mm) x 100.

2.2. Avaliação da punctura

Para medir a resistência das bainhas das plantas à punctura, amostras das bainhas obtidas dos tratamentos com as plantas inoculadas ou não com *R. solani* e supridas ou não com Si foram coletadas e imediatamente submetidas à introdução de uma fina agulha metálica hipodérmica (30 µm de diâmetro). A força exercida pela agulha para atravessar a bainha foi medida em N (Newton) através do aparelho digital Instron 5564[®]. A agulha foi introduzida da parte abaxial para a parte adaxial de cada pedaço de bainha. Após a introdução da agulha e a medição da resistência, os pedaços de bainhas foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 2 mL de álcool a 70%. A solução de álcool foi trocada diariamente até completa remoção da clorofila. As bainhas clareadas foram montadas em lâminas de vidro contendo algumas gotas do meio de montagem de Hoyer (Cunningham, 1972) e essas foram observadas no microscópio de luz (Carl Zeiss, Axio Imager 1A). Utilizaram-se os dados da resistência à punctura somente das bainhas nas qual a agulha não havia perfurado as nervuras.

2.4. Determinação de Silício

A concentração de Si nas bainhas das plantas supridas ou não com Si foi determinada pelo método colorimétrico (Korndörfer *et al.*, 2004). Os pedaços de bainhas foram coletados às 120 hai das plantas das repetições de cada tratamento, secos em estufas a 65°C até atingir peso constante, moídos em moinho tipo Thomas-Wiley e o pó obtido passado em peneira de 40 mesh.

2.5. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente causalizado em esquema fatorial 2 x 2 com quinze repetições. Os fatores estudados foram: duas cultivares de arroz e presença (+Si) ou ausência (-Si) de Si na solução nutritiva. Cada repetição foi constituída de um vaso contendo uma planta de arroz, da qual apenas uma bainha foi inoculada com *R. solani*. Os dados da concentração de Si foram submetidos à

ANOVA e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas lesões nas bainhas das plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 (Fig. 1A) e Labelle (Fig. 1B) às 24 hai. Para a cultivar BR-Irga 409, não houve diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si às 48 e 72 hai (Fig. 1A). Às 96 hai, houve um acréscimo de 18% no CRL nas bainhas das plantas não supridas com Si em relação às bainhas das plantas supridas com esse elemento (Fig. 1A). Para a cultivar Labelle, não houve diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si das 48 às 96 hai.

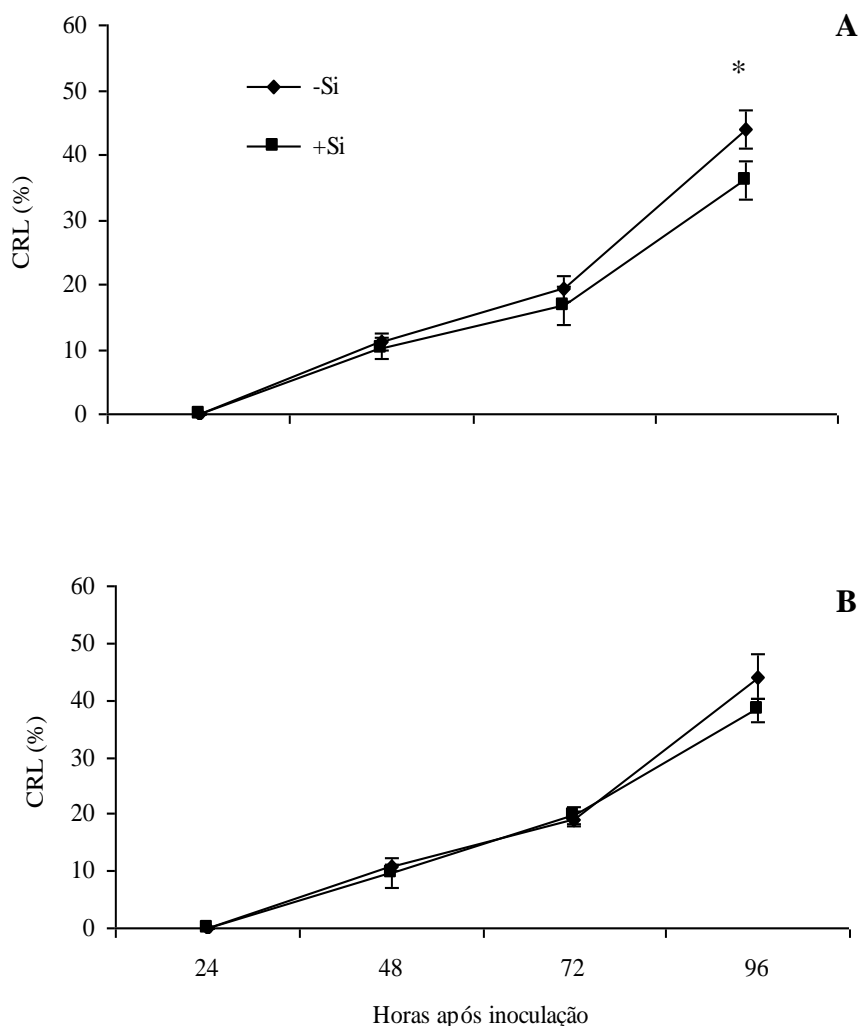


Figura 1. Comprimento relativo da lesão (CRL) da queima das bainhas nas bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 (A) e Labelle (B), supridas (+Si) ou não (-Si) com silício após inoculação com *Rhizoctonia solani*. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas por asterisco diferem pelo teste-*t* ($P \leq 0,05$).

Não houve efeito significativo do fator cultivares e da interação cultivares x presença ou ausência de Si na solução nutritiva ($P = 0,05$) para a concentração de Si nas bainhas. Porém, na presença de Si na solução nutritiva, a concentração desse elemento nas bainhas das plantas de arroz aumentou significativamente em 75% em relação à ausência desse elemento (Fig. 2).

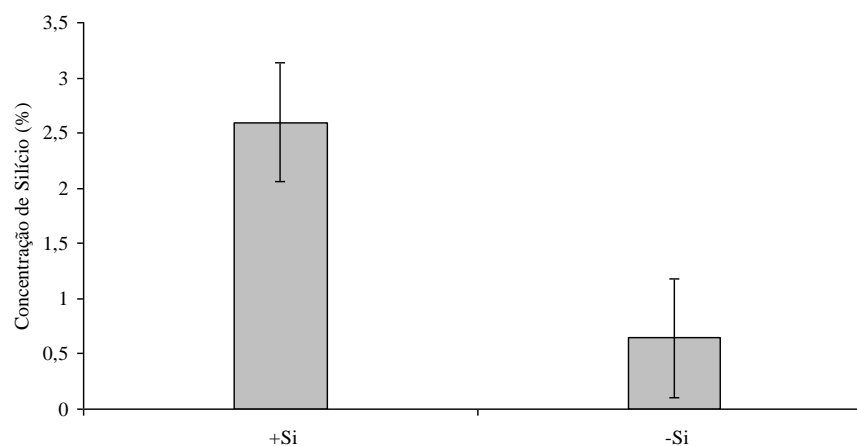


Figura 2. Concentração de silício (%) nas bainhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. O desvio padrão está representado em cada barra.

Nas bainhas das plantas das cultivares BR-Irga 409 e Labelle, supridas ou não com Si, não inoculadas com *R. solani*, a força máxima necessária para que a agulha atravessasse a bainha foi, respectivamente, de 0,17 e 0,16 N. Às 24 hai, embora não tenha-se observado lesões nas bainhas, observou-se a presença de hifas de *R. solani* sobre as bainhas. Para essa época, as forças necessárias para a agulha atravessar as bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409, supridas ou não com Si, foram de 0,10 e 0,10 N (Fig. 3A). Para a cultivar Labelle, esses valores foram, respectivamente, de 0,16 e 0,15 N (Fig. 3B).

Para as duas cultivares, houve diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si às 48 e 72 hai com relação a força necessária para a agulha atravessar a bainha. Para a cultivar BR-Irga 409, os valores foram de 0,07 e 0,09 N e para a cultivar Labelle de 0,06 e 0,11 N, respectivamente, para os tratamentos -Si e +Si (Fig. 3A-B). Às 72 hai, os valores da força para a agulha atravessar a bainha foram de 0,03 e 0,07 N para a cultivar BR-Irga 409 e de 0,03 e 0,05 N para a cultivar Labelle, respectivamente para os tratamentos -Si e +Si (Fig. 3A-B). Às 96 hai, independente da cultivar, não houve diferença significativa entre os tratamentos -Si e +Si com relação a força necessária para a agulha atravessar as bainhas (Fig. 3A-B).

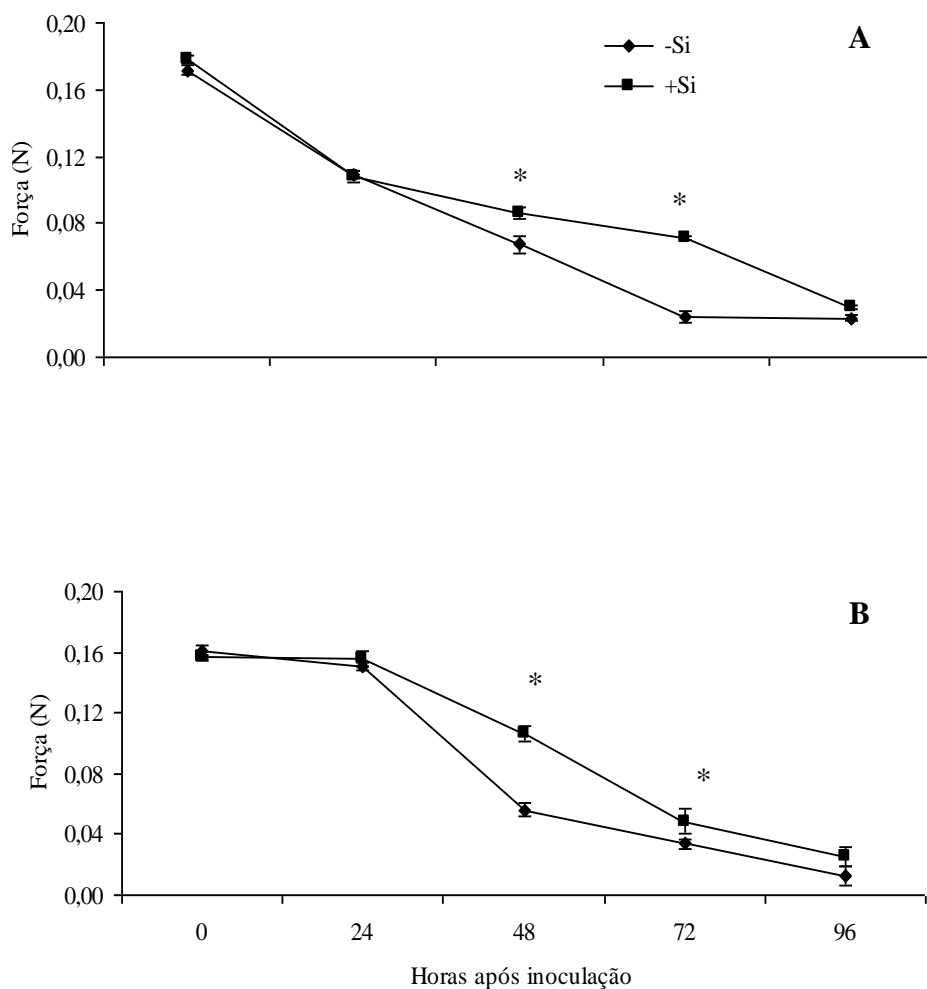


Figura. 3. Força (N) necessária para a agulha atravessar a bainha das plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 (A) e Labelle (B), supridas (+Si) ou não (-Si) com silício após inoculação com *Rhizoctonia solani*. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas por asterisco diferem pelo teste-t ($P \leq 0,05$).

Com base nos dados obtidos nesse estudo, plantas de arroz supridas com Si responderam à infecção por *R. solani* através do fortalecimento da parede celular das células da bainha. Esse trabalho evidencia que a resistência das bainhas à punctura é devido a deposição de Si e está associada a uma redução no CRL da queima das bainhas. Observações semelhantes foram feitas por Ito & Sakamoto (1939), os quais mensuraram a resistência à punctura em folhas de arroz e observaram que em plantas crescendo em substrato contendo silicato de sódio, a resistência à punctura foi maior e o comprimento da lesão foi menor. Portanto, a resistência à punctura nas bainhas de arroz não necessariamente representa a resistência contra a penetração indireta da *R. solani*, devendo ser considerado a capacidade do fungo de penetrar pelos estômatos (Ou, 1985).

Suzuki (1940) mostrou que as células silicificadas ocorreram em maior número quando as plantas de arroz encontravam-se no sistema de inundação em comparação com solos com baixa umidade. Ito & Sakamoto (1939) observaram que a resistência à punctura decresceu com a diminuição da umidade do solo. Ito & Sakamoto (1939) estudando a epiderme da folha de arroz, mostraram que a resistência à punctura não esteve associada somente às células silicificadas, mas com a perda de água dos tecidos durante a determinação da resistência à punctura, a qual causou uma instabilidade na turgidez da célula. As bainhas de arroz são destacadas da planta durante o teste para determinar a resistência à punctura ocorrendo, nesse caso, perda de água dos tecidos e a diminuição da real resistência à punctura.

De acordo com Ito & Sakamoto (1939), a resistência à punctura em folhas de arroz aumentou com a idade da planta. Rodrigues *et al.* (2003) relataram que plantas inoculadas com 45 e 130 dias foram mais resistentes a doenças que plantas com 85 dias. Além disso, os autores observaram um decréscimo na concentração de Si com o aumento da idade das plantas de arroz, ou seja, do estágio vegetativo até ao emborrachamento. Possivelmente, o aumento da resistência das bainhas à punctura em plantas mais velhas possa estar correlacionado com a lignificação dos tecidos e não necessariamente com a concentração de Si. Tsai (1974) também obteve resultados similares, ou seja, a maior severidade da queima das bainhas ocorreu nas plantas nos estádios de máximo perfilhamento e emborrachamento. Ou (1985) evidenciou que as plantas jovens de arroz são mais resistentes do que as mais velhas e que o fungo *R. solani* torna-se mais agressivo em plantas no início da emissão da panícula e na fase de enchimento dos grãos. Suspeita-se que no estágio de máximo perfilhamento, a planta de arroz é fisiologicamente mais suscetível à infecção por *R. solani*.

A menor resistência das bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409 e Labelle à punctura, respectivamente, às 24 e 48 hai deve-se, provavelmente, ao rápido crescimento do fungo na sua superfície concomitantemente com morte rápida das células. Estudos mostram que plantas de arroz supridas com Si são mais resistentes à brusone devido a presença de células densamente silicificadas na epiderme (Hemmi *et al.*, 1941; Ito & Hayashi 1931; Suzuki, 1940) ou pela formação da dupla camada sílica-cutícula (Yoshida *et al.*, 1962).

Com base nos resultados do presente estudo, evidencia-se que a resistência das bainhas de plantas de arroz à queima das bainhas deve-se, em parte, a uma maior resistência física ocasionada pela deposição de Si, a qual colabora para uma redução no tamanho da lesão.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Datnoff LE, Rodrigues FÁ, Seebold KW. (2007) Silicon and plant diseases. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (Eds.) Mineral Nutrition and Plant Diseases, St. Paul, MN, USA APS Press, p. 233-246.
- Cunningham JL. (1972) A miracle mounting fluid for permanent wholemounts of microfungi. *Mycologia* 64:906-911.
- Groth DE, Rush MC, Lindberg GD. (1990) Foliar fungicides for control of rice diseases in the United States. In: Grayson BT, Green MB, Copping LG. (Eds.). *Pest Management in Rice*. Elsevier, London, p.31-52.
- Hawkins LA, Harvey RB. (1919) Physiological study of the parasitism of *Pythium debaryanum* Hesse on potato tuber. *Journal of Agriculture Research* 18:275-297.
- Hemmi T, Abe T, Inoue Y. (1941) Studies on the rice blast disease: Relation of the environment to the development of blast disease and races of the blast fungus. *Noji Kairyō Shiryo* 157:1-232.
- Hoagland R, Arnon I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Circular of the California Agricultural Experiment Station* 347:1-32.
- Ishiguro K. (2001) Review of research in Japan on the roles of silicon in conferring resistance against rice blast. In: *Silicon in Agriculture*. Datnoff LE, Snyder G.H, Korndörfer GH. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. p.277-291.
- Ito S, Hayashi H. (1931) On the relation of silica supply to rice blast. *Journal Sapporo Society Agriculture Science* 103:460-461.
- Ito S, Sakamoto M. (1939) Studies on rice blast. *Res. Hokkaido Univ. Bot. Lab. Fac. Agric. Rep.* 1939-1943.
- 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, 24p.
- Li Z, Pinson SRM, Marchetti MA, Stansel JW, Park WD. (1995) Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theoretical and Applied Genetics* 91:382-388

- Ma JF, Takahashi E. (2002) Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan. Amsterdam: Elsevier.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130:2111-2117.
- Ma FJ, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448:209-213.
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* 440:688-691.
- Melander LW, Craigie JH. (1927) Nature of resistance of *Berberis* spp. to *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 17:95-115.
- Ou SH. (1985) Rice Diseases. 2nd Edition. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 380p.
- Ogoshi A. (1987) Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* 25:125-143.
- Rodrigues FÁ, Vale FXR, Datnoff LE, Prabhu AS, Korndörfer GH. (2003) Effect of rice growth stages and silicon on sheath blight development. *Phytopathology* 93:256-261.
- Rodrigues FÁ, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC. (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Diseases* 85:827-832.
- Rush MC, Lee FN. (1992) Sheath blight. In: Webster RK, Gunnell PS. (Eds.). *Compendium of Rice Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. p.22-23.
- Sangster AG, Hodson MJ, Tubb HJ. (2001) Silicon deposition in higher plants. In Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH. (Eds.) *Silicon in Agriculture*. Amsterdam: Elsevier. p.85-114.
- Suzuki H. (1940) On the relationship between rice susceptibility and penetration into host plants. *Ngayo Oyobi Engei* 10:1999-2010.
- Tsai WH. (1974) Assessment of yield losses due to rice sheath blight at different inoculation stages. *Journal of Taiwan Agriculture Research* 23:188-194.
- Yamaji N, Mitatni N, Ma JF. (2008) A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The Plant Cell* 20:1381-1389.
- Yoshida S, Ohnishi Y, Kitagishi K. (1962) Chemical forms, mobility and deposition of silicon in rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 8:15-21.

Capítulo 3

Análise Microscópica da Resistência do Arroz à Queima das Bainhas Mediada pelo Silício

RESUMO

Análise Microscópica da Resistência do Arroz à Queima das Bainhas Mediada pelo Silício

A segunda mais destrutiva doença na cultura do arroz, é a queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn. Embora o Si seja capaz de decrescer a intensidade da queima das bainhas, o(s) mecanismo(s) da resistência mediada(s) por esse elemento permanece(m) desconhecidos. Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar, a nível microscópico, a resistência do arroz à queima das bainhas potencializada pelo Si. A concentração de Si nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga-409 e Labelle supridas com Si acumulou 2,9 e 2,3%, respectivamente, e não ocorrendo diferença significativa. As plantas supridas com Si absorveram 86% mais Si que as plantas não supridas com esse elemento. Em imagens capturadas pela microanálise de raio-X, verificou-se que na superfície abaxial das bainhas das plantas de arroz das duas cultivares, supridas com Si, havia uma intensa deposição de Si. Na cultivar BR-Irga-409 não suprida com Si, houve um aumento no comprimento relativo (CRL) da lesão da queima das bainhas às 48 e 72 hai. Para a cultivar Labelle o acréscimo foi significativo às 96 e 120 hai. Na ausência de Si, às 24 hai, foi observado áreas necrosadas sem a presença de hifas de *R. solani* em bainha da cultivar BR-Irga-409. Às 72 hai, a extensão da área necrosada nas bainhas das duas cultivares de plantas supridas ou não com Si, foram semelhantes. Exceto para as bainhas da cultivar BR-Irga-409 suprida com Si. As plantas supridas com Si apresentaram um menor crescimento de hifas de *R. solani* sobre o tecido de bainhas de arroz nas duas cultivares. Cortes feitos em bainhas de arroz, após 96 hai, apresentaram uma diminuição na proporção e na intensidade da autofluorescência em relação ao material sadio. Nos cortes de bainhas das duas cultivares supridas com Si, constatou-se uma maior intensidade de autofluorescência na epiderme celular como nos feixes vasculares em relação aos cortes de bainhas não supridas com Si. As plantas de arroz, supridas com silício, reduziram o CRL da queima das bainhas, apresentaram menor crescimento superficial de hifas de *R. solani* em bainhas de arroz, menor área necrosada e maior intensidade autofluorescência em cortes transversais de bainhas de arroz.

Palavras chaves: *Rhizoctonia solani*, necrose, nutrição mineral, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz, microscopia de fluorescência e microanálise de raio-X.

ABSTRACT

Microscopic analysis of resistance to the sheath blight of Rice Mediated by Silicon Sheaths

The second most destructive disease in rice, is sheath blight of the sheaths, caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. Although Si is capable of decreasing the intensity of the blight of the sheaths, the (s) mechanism (s) mediated resistance (s) for this element remains (m) unknown. Thus, this study aimed to investigate the microscopic level, resistance to blight rice sheaths potentiated by Si Si concentration in the sheaths of the plants of cultivar BR-409-Irga Labelle and met with Si and accumulated 2.9 2.3%, respectively, and no significant differences. The plants supplied with Si absorbed 86% more than the plants not supplied with this element. In images captured by the X-ray microanalysis, it was found that the abaxial surface of the sheaths of rice plants of two cultivars, being supplied with Si, there was an intense deposition of Si cultivar BR-409-Irga is not supplied with Si, an increase in the relative length (CRL) of the lesion from the blight of the sheaths 48 and 72 hai. To cultivate the addition Labelle was significant at 96 and 120 hai. In the absence of Si at 24 hai, we observed necrotic areas without the presence of hyphae of *R. solani* sheath of BR-Irga-409. At 72 hai, the extent of the necrotic area in the sheaths of two cultivars of plants supplied with Si or not, were similar. Except for the sheaths of the Br-Irga-409 supplied with Si plants supplied with Si showed a lower growth of hyphae of *R. solani* on rice sheath tissue in both cultivars. Sections made in sheaths of rice after 96 hai, showed a decrease in the proportion and intensity of autofluorescence in relation to sound material. In sections of the sheaths of two cultivars supplied with Si, there was a greater intensity of autofluorescence in the epidermal cell in the vascular bundles as compared to cuts sheaths not supplied with Si The rice plants supplied with silicon, reduced the CRL blight of the sheaths showed lower surface growth of hyphae of *R. solani* on rice sheaths, smaller necrotic area and higher autofluorescence intensity in transverse sections of sheaths of rice.

Keywords: *Rhizoctonia solani*, necrosis, nutrition, scanning electron microscopy, light microscopy, fluorescence microscopy and X-ray microanalysis.

1. INTRODUÇÃO

A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma das mais importantes e destrutivas doenças que afetam a produção de arroz no mundo (Ou, 1985). A obtenção de cultivares de arroz com resistência à essa doença têm sido uma das metas nos programas de melhoramento genético. Até o presente momento, nenhuma fonte de resistência completa à queima das bainhas foi encontrada (Li *et al.*, 1995), o que leva a constante busca por alternativas de controle desta doença.

Embora o silício (Si) não seja ainda reconhecido como um elemento essencial para a maioria das espécies de plantas, o papel benéfico desse elemento no crescimento e na resistência das plantas aos diferentes tipos de estresses bióticos (doenças e pragas) e abióticos (toxidez por metais pesados e déficit hídrico) foram verificados em um grande número de espécies de plantas (Ma, 2004). O aumento na concentração de Si nos tecidos das plantas de arroz tem sido associado com a resistência à brusone, mancha marrom, podridão do colmo, escaldadura da folha, queimas das bainhas e escurecimento dos grãos (Datnoff *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2003; Seebold *et al.*, 2001).

Uma das hipóteses para a redução na intensidade das doenças pelo Si, deve-se, em parte, ao depósito desse elemento na parede celular e também abaixo da cutícula, formando uma dupla camada cutícula-sílica na folha do arroz. As células silicatadas também são observadas na epiderme e nos tecidos vasculares do caule, bainha, folha, além da casca do arroz (Yoshida *et al.*, 1962; Ma e Yamaji, 2006).

Kim *et al.* (2002) utilizando a microscopia eletrônica de varredura associada com a técnica de micro-análise de raio-X investigaram algumas características citológicas da resistência do arroz à brusone mediada pelo Si. Os autores verificaram que a fortificação da parede celular das células da epiderme foi responsável pela redução do número de lesões da brusone. Portanto, é plausível que resistência das plantas de arroz à infecção pelos fungos *Pyricularia grisea* e *R. solani* é mais complexa do que a resistência oferecida fisicamente pelas células silicificadas.

A autofluorescência das células da epiderme e do mesófilo podem indicar uma resposta de defesa da planta a infecção por patógenos. De acordo com Zeyen *et al.* (1993), o Si tem um papel fisiológico e/ou bioquímico durante a penetração do fungo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* nas células da epiderme de folha de cevada. Esses autores demonstraram que o Si solúvel estava presente em quantidades consideráveis durante e após a deposição de papilas nas células da epiderme das folhas de cevada

infectadas por *B. graminis* f.sp. *hordei*. Plantas de aveia inoculadas com *B. graminis* f.sp. *avenae* não supridas com Si apresentaram um aumento na frequência e na intensidade de células da epiderme que se tornaram autofluorescentes, o que indicou o acúmulo de compostos fenólicos (Carver *et al.*, 1998). Menzies *et al.* (1991) mostraram que plantas de pepino supridas com Si tornaram-se mais resistentes ao oídio devido ao acúmulo de compostos fenólicos próximo ao local de penetração do fungo. Bélanger *et al.* (2003) estudando as células da epiderme de plantas de trigo supridas com Si, constataram a reação da planta ao ataque do fungo *B. g.* f.sp. *tritici* pela formação de papilas, produção de calose e a presença de um material eletro-denso osmiofílico, identificado por marcação citoquímica como sendo agliconas. O material fenólico não estava somente na parede celular, mas associado com os haustórios desintegrados. De acordo com Rémus-Borel *et al.* (2005), plantas de trigo supridas com Si produziram fitoalexinas em resposta à infecção por *B. g.* f.sp. *tritici*.

Plantas de arroz supridas com Si apresentaram um aumento na produção de compostos fenólicos e, conseqüentemente, maior a resistência à brusone (Rodrigues *et al.*, 2003). Além disso, ocorreu um aumento na produção de fitoalexinas momilactonas A e B (Rodrigues *et al.*, 2004) e uma maior ativação dos genes β -1,3-glucanase, peroxidase e PR-1 (Rodrigues *et al.*, 2005). Winslow (1992) mostrou que o Si somente reduziu a severidade da queima das bainhas em cultivares de arroz do grupo *indica* e não do grupo *japônica*. Por um outro lado, Rodrigues *et al.* (2001) demonstraram que Si reduziu o progresso da queima das bainhas em cultivares de arroz suscetíveis e moderadamente resistentes, tanto do grupo *indica* quanto *japônica*. O período de incubação da queima das bainhas em arroz não foi afetado pelo aumento nas doses de Si aplicados no solo, mas o número total de lesões nas bainhas, a área abaixo da curva do progresso da queima das bainhas, a severidade, o comprimento relativo da lesão decresceram significativamente (Rodrigues *et al.*, 2003a).

Embora o Si seja capaz de decrescer a intensidade da queima das bainhas, o(s) mecanismo(s) da resistência mediada(s) por esse elemento permanece(m) desconhecidos. Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar, a nível microscópico, a resistência do arroz à queima das bainhas potencializada pelo Si.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento das plantas

Sementes de arroz das cultivares Labelle (*japônica*) e BR-Irga 409 (*índica*) foram germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidas a 25°C. Após a germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em solução nutritiva utilizando a metade da concentração por sete dias sem adição de Si. Posteriormente, as plântulas foram crescidas em vasos com volume de 0,5 L de solução nutritiva modificado de Hoagland & Arnon. (1950) a qual era composta dos seguintes nutrientes: 1 mol.L⁻¹ KNO₃; 0,25 mol.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mol.L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mol.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 mol.L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,3 mmol.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 mmol.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 mmol.L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 mmol.L⁻¹ MnCl₃.4H₂O; 0,014 mmol.L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 mmol.L⁻¹ Na₂EDTA e 25 mmol.L⁻¹ FeSO₃. Para o preparo da solução nutritiva, utilizou-se 1 ml de cada nutriente para cada 9 mL de água deionizada. Plantas crescidas em solução nutritiva sem a adição de ácido monossilícico serviram como controle. As plantas foram supridas com Si, adicionando-se o ácido monossilícico à solução nutritiva até a concentração de 2 mmol/l. O ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio (4,5 mL/L de água) através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite-120, Fluka) (Ma *et al.*, 2002). A solução nutritiva foi trocada a cada 4 dias e o pH foi verificado a cada dois dias sendo mantido na faixa de 5,5 a 6. As plantas foram crescidas na solução nutritiva descrita anteriormente até 30 dias após o transplante e com 1,5 vezes a concentração utilizada anteriormente até o máximo perfilhamento (60 dias).

2.2. Produção do inoculo, inoculações e avaliações

As plantas foram inoculadas no estágio de máximo perfilhamento, utilizou-se o isolado *Rs-1* de *R. solani* AG1-1A cedido pelo Dr. Anne Sitarama Prabhu da Embrapa Arroz e Feijão. O fungo foi crescido em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e discos do meio contendo micélio do fungo foram retirados e distribuídos em novas placas de Petri contendo BDA o qual continha na superfície do meio, pedaços de palito de dente de 1 cm de comprimento. Os palitos de dente foram lavados em água quente, para retirada das possíveis substâncias tóxicas, posteriormente foram misturados ao

BDA e esterilizados em autoclave por 20 minutos, antes de serem transferidos para placas de petri. Os pedaços de palito com BDA serviram como suporte para crescimento do fungo. As placas foram transferidas para câmara de crescimento (25 °C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro) onde permaneceram por 5 dias. Pedaços de palitos de dente contendo o fungo foram transferidos para a segunda bainha do perfilho principal de cada planta. A bainha foi amarrada com um fitilho para garantir o contato dessa com o fungo. As plantas que receberam apenas o palito de dente sem o fungo, serviram como controle.

Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25°C, umidade relativa de 95%. Avaliou-se a doença às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) determinando-se o comprimento relativo da lesão (CRL) em cada bainha, medindo-se com o auxílio de um paquímetro digital, o comprimento da lesão (CL) e o comprimento da bainha (CB), em mm. O comprimento relativo da lesão (CRL) foi calculado dividindo o comprimento da lesão (em mm) pelo comprimento da bainha (em mm) x 100.

2.3. Determinação de Silício

Após o término do experimento, as bainhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, secadas em estufa a 65°C até atingirem peso constante e moídas em moinho tipo Wiley para determinação da concentração de Si (Korndörfer *et al.*, 2004).

2.4. Preparo das amostras para microscopia de luz

Nos estudos de microscopia de luz, foram coletados cerca de três pedaços de bainhas (\approx 10 cm de comprimento) das plantas das repetições de cada tratamento às 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). Pedaços de bainhas coletadas de plantas não inoculadas serviram como controle. Os pedaços das bainhas foram cortados em fragmentos de \approx 2 cm de comprimento e colocados em tubos de microcentrífuga identificados com as letras A, B, C, D e E. As sequências para a obtenção dos cortes foram: a 2 cm acima do local de inserção do palito de dente contendo o fungo (posição A); no local de inserção do palito de dente contendo o fungo, ou seja, no local de infecção (posição B); a 2 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o fungo (posição C); a 4 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o

fungo (posição D) e a 6 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o fungo (posição E). Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para solução de etanol 70% (vol/vol), a qual foi trocada diariamente por até 7 dias. Em seguida, os fragmentos foram clareados em solução de cloral hidratado (500 g/L). Dos fragmentos clareados, a nervura central foi removida antes da montagem desses em lâminas de vidro com parte abaxial para cima. Utilizou-se como meio de montagem, solução contendo glicerina + água (75/25%, respectivamente) e 2 gotas de ácido láctico (1,5%). As lâminas com os fragmentos de bainhas foram observadas no microscópio de luz (Carl Zeiss, Axio Imager 1A) no aumento de 400 × em campo claro. As imagens foram capturadas digitalmente (Canon A620). Em cada fragmento da bainha, mediu-se o comprimento da região necrosada e o comprimento da bainha com paquímetro digital. Os fragmentos de bainhas de todas as posições coletadas foram observados no microscópio de luz para a presença ou ausência de hifas de *R. solani*.

2.5. Quantificação do crescimento micelial

Para quantificar o crescimento micelial de *R. solani* nas bainhas das plantas das repetições de cada tratamento, um total de 15 pedaços de bainhas ($\approx 1 \text{ cm}^2$) foram coletados às 24, 36, 48 e 72 hai. Os pedaços das bainhas foram colocados em frascos de vidro contendo solução de etanol 70% (vol/vol), a qual foi trocada diariamente até a remoção completa da clorofila. Para observar o crescimento micelial de *R. solani* na superfície das bainhas, os fragmentos foram corados com solução de azul de toluidina O (0,1%) e azul de Tripán (0,1%) por 30 segundos. Os fragmentos foram lavados com água destilada três vezes para retirar o excesso de corante. A nervura central foi removida dos fragmentos das bainhas antes da montagem com a parte abaxial para cima, nas lâminas, adicionou-se algumas gotas de uma solução de montagem de Hoyer (Cunningham, 1972). As lâminas foram observadas no microscópio de luz (Carl Zeiss, Axio Imager 1A) no aumento de 400 × e as imagens foram capturadas digitalmente (Canon A620).

2.6. Obtenção da equação da discriminante

A obtenção da equação discriminante, a imagem de um fragmento de bainha obtido às 48 hai foi processada no programa QUANT (Liberato, 2003). A área, em porcentagem, correspondente aos pixels selecionados correspondentes às hifas de *R.*

solani coradas e das células da bainha foram analisados no programa estatístico SAS 9.0 para obter a função discriminante. Com a análise discriminante, formulou-se a equação da discriminante e com auxílio do QUANT foi possível estimar as porcentagens das áreas das bainhas contendo crescimento superficial de *R. solani*, foi obtido para as amostras de cada tratamento utilizando-se essa equação no programa Quant. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

2.7. Preparo das bainhas de arroz para microscopia de fluorescência

Para a microscopia de fluorescência, um total de 5 pedaços das bainhas ($\approx 3 \text{ cm}^2$) foram obtidos de plantas de arroz das repetições de cada tratamento às 96 hai. Pedaços de bainhas coletados de plantas não inoculadas das repetições de cada tratamento serviram como controle. Após a coleta, as bainhas foram colocadas em pacotes de papel alumínio, congeladas com N_2 e armazenadas em freezer a -20°C . A nervura central das bainhas foi removida e com auxílio de um bisturi, foram obtidos cortes semi-finos transversais dos fragmentos das bainhas. Os cortes semi-finos foram colocados em vidro de relógio contendo água e gelo. Os melhores cortes foram selecionados e imediatamente montados em lâminas de vidro utilizando-se água destilada. Os cortes foram observados no microscópio de luz, em campo claro, no aumento de $400 \times$ atentando-se para região necrosada. A autofluorescência da parede das células da bainha, bem como da célula como um todo, foi determinada por fluorescência utilizando-se o filtro azul (excitação de 365 nm e barreira de 400 nm). A presença de compostos fenólicos foi confirmada observando no microscópio de luz alguns cortes de bainhas obtidas de plantas da cultivar Labelle não inoculadas com *R. solani*. Os cortes foram corados com azul de toluidina O (0,1%) por 30 segundos. Todas as imagens foram capturadas digitalmente (Canon A620).

2.8. Preparo das bainhas de arroz para microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), 5 pedaços de bainhas ($\approx 3 \text{ cm}^2$) foram coletados das plantas das repetições de cada tratamento às 96 hai. Os pedaços das bainhas foram seccionados em tamanhos de 500 mm^2 e colocados em tubos de vidro contendo fixativo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 5 dias na temperatura 4°C . Os pedaços de bainha foram lavados

cuidadosamente com tampão cacodilato até três vezes e desidratados em uma série de etanol a 30, 50, 70, 80, 95 e 100% (Matsuoka & Vanetti, 1993). Após desidratação, os pedaços das bainhas foram submetidos à secagem ao ponto crítico utilizou-se CO₂ e álcool etílico 100% como fluídos no aparelho “Critical Point Dryer” (Bal-Tec, Modelo CPD030). Os pedaços das bainhas foram montados sobre suporte metálico e a parte abaxial da bainha foi coberta com filme de ouro paládio (2 nm) por meio de pulverização catódica. As amostras foram observadas no MEV (LEO modelo VP1430) operado entre 15-20 kV com captura digital das imagens. Na parte abaxial dos pedaços das bainhas obtidas das plantas dos quatro tratamentos, observou-se o crescimento superficial das hifas de *R. solani*. Um total de até três pedaços de bainhas obtidas das plantas das repetições de cada tratamento foram observadas no MEV. Várias regiões na superfície das bainhas foram fotografadas sempre no mesmo aumento.

2.9. Preparo das bainhas de arroz para micro-análise de raio-X

Para a micro-análise de raio-X, pedaços de bainhas ($\approx 4 \text{ cm}^2$) foram coletados das plantas das repetições de cada tratamento às 96 hai. Os pedaços das bainhas foram desidratados em temperatura ambiente entre várias camadas de jornais com troca diária. Após desidratação, a parte abaxial dos pedaços das bainhas foi coberto com filme de ouro paládio e observadas no MEV acoplado a um detector de raio-X modelo CAMECA SX-100 Universal EPMA (Cameca instruments Inc., Trumbull, USA), operado na voltagem de 15 kV e corrente de 20 nA. A distribuição de Si na superfície dos pedaços das bainhas das plantas das repetições de cada tratamento foi capturada digitalmente. Foram examinados três pedaços de bainha obtidas das plantas das repetições de cada tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de Si nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga-409 e Labelle supridas com Si acumularam 2,9 e 2,3%, respectivamente, e não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Já nas plantas não supridas com Si, as bainhas da cultivar BR-Irga-409 e Labelle apresentaram 0,4 e 0,3%, respectivamente, também não houve diferença significativa entre esses tratamentos ($P > 0,05$). Mas as plantas supridas com

Si comparadas com plantas não supridas, a concentração de Si na bainha aumentou em 86%, sendo significativa ($P < 0,05$). Rodrigues *et al.* (2001) descreveram que plantas de arroz supridas com Si, houve um aumento em 80% na concentração de Si nas bainhas das plantas de arroz. Dallagnol *et al.* (2009) encontraram um aumento de até 320% de Si em folhas de plantas de arroz, crescidas em solução nutritiva suprida com Si, em relação às não supridas com esse elemento.

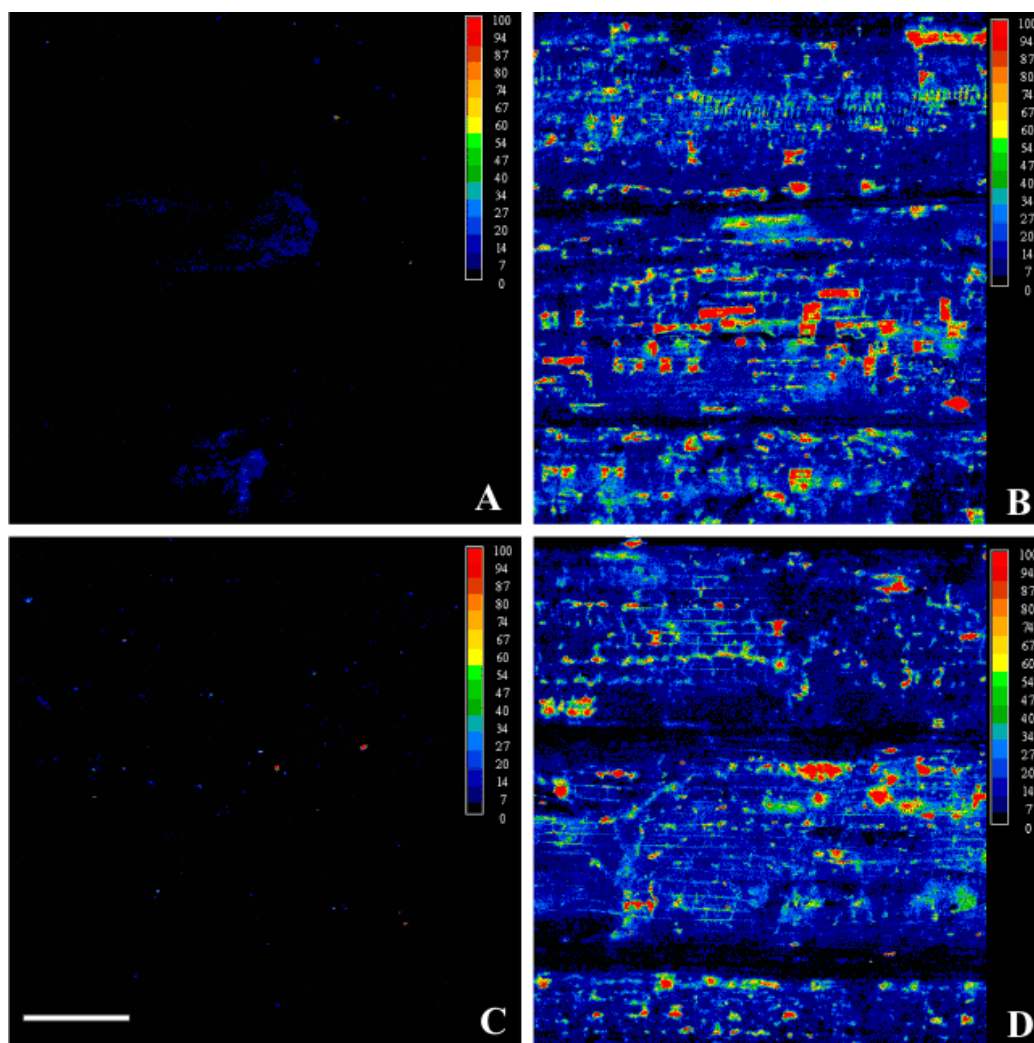


Fig. 1 Microanálise de raio-x da superfície abaxial das bainhas de plantas de arroz, crescidas na ausência (A e C) ou presença (B e D) de silício, das cultivares BR-Irga-409 (A e B) e Labelle (C e D) às 96 horas após a inoculação com *R. solani*. A cor vermelha indica maior deposição de Si e a cor preta representa ausência do elemento.

A diferença no depósito de Si entre os tratamentos foi interpretado com base nas imagens capturadas pela microanálise de raio-x, constatou-se que a superfície abaxial das bainhas das plantas de arroz das duas cultivares, supridas com Si, observou-se intensa deposição de Si, ao contrário do que foi observado em plantas não tratadas com esse elemento (Fig. 1) demonstrando assim o acúmulo deste elemento nas bainhas e

ausência deste elemento em plantas testemunhas. O padrão de depósito de Si na superfície abaxial da bainha de arroz, foi similar nas duas cultivares demonstrada pela microanálise de raio-x. As duas cultivares apresentam as mesmas características, sendo homogêneas o depósito de Si na parte abaxial de bainhas de arroz. Domiciano *et al.* (2009) estudando a superfície de plantas de trigo, observou que o depósito de Si foi linear, o qual correspondeu às células silicatadas, observou-se que o Si também foi depositado nos tricomas. Guével *et al.* (2007) através da microanálise de raio-x observou, um maior depósito de Si na superfície de folhas de trigo quando as plantas absorveram o Si via raiz em comparação com a aplicação foliar desse elemento. Rezende *et al.* (2009) analisaram por microanálise de raio-x folhas de arroz de plantas supridas com Si e encontraram, deposição do elemento na parte adaxial e abaxial das folhas quando supridas com silicato de cálcio.

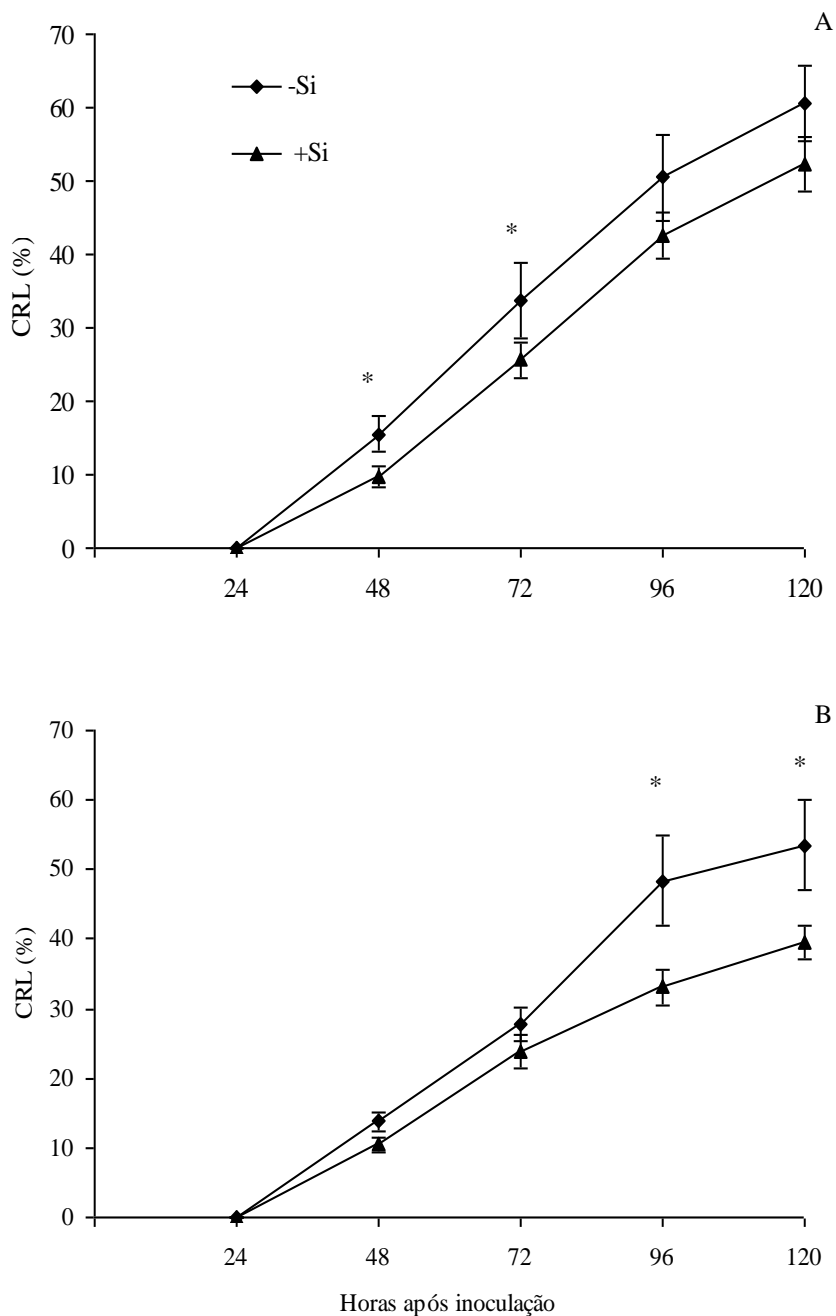


Fig. 2 Comprimento relativo da lesão (CRL) da queima das bainhas, em bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (A) e Labelle (B), supridas com (+Si) ou não (-Si). Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco para cada época de avaliação difere pelo teste-*t*, ($P \leq 0,05$).

Na Fig. 2 podemos verificar o CRL da queima das bainhas nas cultivares BR-Irga-409 e Labelle supridas ou não com Si. Verificamos que às 24 hai não foram observado sintomas da doença, o que ocorreu a partir das 48 hai nas bainhas das plantas de todos os tratamentos. Microscopicamente, com a retirada da pigmentação da bainha, foi possível visualizar uma área necrosada às 24 hai A partir das 48 e 72 hai no tratamento da cultivar BR-Irga-409 -Si houve um aumento significativo de 37 e 24%

respectivamente, no CRL em relação ao tratamento com +Si. Já para o tratamento da cultivar Labelle -Si o acréscimo significativo foi de 31 e 26% às 96 e 120 hai respectivamente, em relação a presença de Si. Rodrigues *et al.* (2001, 2003) mostraram que o suprimento de Si reduziu a severidade e área abaixo da curva do progresso da extensão da lesão da queima das bainhas de arroz. Resultados semelhantes foram obtidos por Winslow *et al.* (1992). O depósito de Si na parede das células da epiderme e abaixo da cutícula, forma uma dupla camada cutícula-Si na bainha do arroz, possam ser os responsáveis pela maior resistência a queima das bainhas em plantas supridas com Si. No entanto, existe a possibilidade de atuarem em conjunto com mecanismos de natureza bioquímica potencializadas pelo Si. Como no caso da brusone, descrito por Rodrigues *et al.* (2004) que demonstraram uma redução na severidade da doença em arroz devido a mecanismos de natureza bioquímica, tais como o aumento na produção de compostos fenólicos e fitoalexinas.

Para as duas cultivares, não foi observado a presença de hifas de *R. solani* às 24 hai. Às 36 hai já foi possível observar hifas de *R. solani* na superfície das bainhas das plantas das duas cultivares nos tratamentos -Si e +Si (Fig. 3). A partir das 36 hai, houve um aumento na porcentagem da área de bainhas contendo hifas de *R. solani* para as duas cultivares. Para cultivar BR-Irga-409 não houve diferença significativa entre as plantas supridas e não com silício (Fig 3A). Já para cultivar Labelle, diferença entre as plantas supridas ou não com Si ocorreu apenas as 48 e 72 hai com maiores porcentagens de crescimento nas bainhas das plantas não supridas com Si (Fig 3B). Segundo Rodrigues *et al.* (2003), com a aplicação de 1,92 g Si/ Kg de solo houve uma diminuição em 40% na área abaixo da curva do progresso relativo da extensão da queima da bainhas em plantas de arroz.

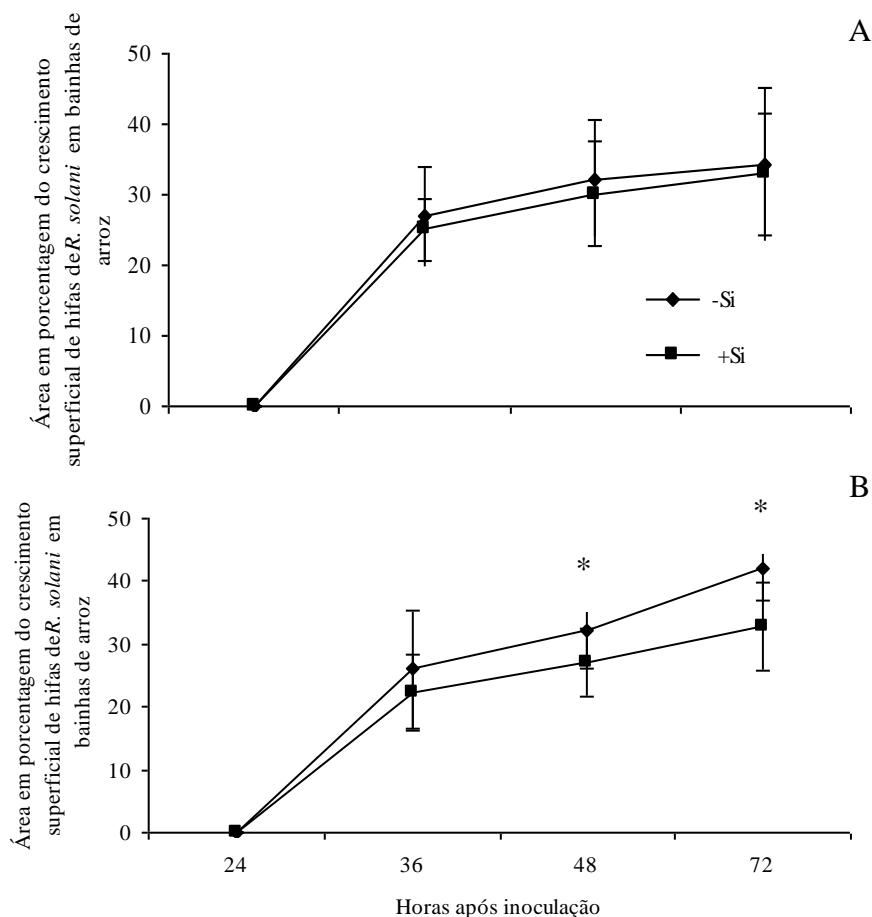


Fig. 3 Crescimento superficial de hifas de *R. solani* (%) nas bainhas das plantas das cultivares Br-Irga-409(A) e Labelle (B), supridas (+Si) ou não (-Si) com silício, em diferentes épocas após a inoculação. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas por asterisco para cada época de avaliação diferem pelo teste-*t* ($P \leq 0,05$).

Na ausência de Si, às 24 hai foram observadas áreas necrosadas sem a presença de hifas de *R. solani* nos fragmentos A e B obtidos nas regiões da bainha para a cultivar BR-Irga-409 (Fig. 4A). Para a cultivar Labelle (Fig. 4C), foi observada a presença de hifas do fungo apenas nos fragmentos da região A. Na presença de Si às 24 hai para a cultivar BR-Irga-409 (Fig. 4B), observou-se a presença de áreas necrosadas com hifas de *R. solani* apenas nos fragmentos obtidos das posições A, B e C e área necrosada sem hifas no fragmento C e D. Já para a cultivar Labelle (Fig. 4D) a ausência de hifas do fungo ocorreu nos fragmentos das posições B, C e D observou-se somente área necrosada.

Possivelmente o fungo apresentou dificuldade de crescimento no tecido, produzindo compostos que necrosam o tecido, para degradar o tecido e facilitar sua colonização. O ácido oxálico (AO) secretado por fungos precipita o cálcio da lamela média levando a formação de cristais de oxalatos de cálcio, aumentando a capacidade da

pectina e pectato sofrerem a degradação enzimática (Smith *et al.*,1986). O estado nutricional das hifas de *R. solani* é importante na agressividade do patógeno, sabe-se que aplicação exógena de glicose nas bainhas de arroz reduziu a severidade da queima das bainhas (Marshall & Rush, 1980). A formação de almofadas de infecção por *R. solani* é induzida por exudatos do hospedeiro (Marshall & Rush, 1980).

Às 36 hai para a cultivar BR-Irga-409 na ausência de Si (Fig. 4A), ocorreu a presença de hifas de *R. solani* nos fragmentos das posições A, B, e C e áreas necrosadas sem fungo na borda do fragmentos A. Na presença de Si, a porcentagem da área dos fragmentos das posições A, B e C contendo hifas do fungo foi maior e áreas necrosadas sem hifas foram observadas nos fragmentos C e D (Fig. 4B). Para a cultivar Labelle, na ausência de Si (Fig. 4C), as hifas de *R. solani* foram encontradas em todas as posições dos fragmentos das bainhas. Já na presença de Si (Fig. 4D), isso ocorreu apenas nas posições A, B e C. Acredita-se que a necrose do tecido sem a presença do fungo deve-se a difusão de toxinas que causam a morte celular. Sabe-se que *R. solani* produz a RS-toxina que quando aplicada sobre tecidos de plantas de arroz reproduz os sintomas da queima das bainhas (Vidhyasekaran *et al.* 1997).

A partir das 36 hai as hifas de *R. solani* cresceram desde o ponto de inoculação (posição B) até atingir a posição E para a cultivar BR-Irga-409, na ausência de Si (Fig. 4A). Na presença de Si, entretanto, o fungo não chegou a posição E (Fig. 4B). Para a cultivar Labelle às 48 hai, a maior porcentagem de área necrosada contendo hifas de *R. solani* ocorreu nas posições A, B, C e D dos fragmentos das bainhas das plantas supridas com Si (Fig. 4D) da qual na ausência desse elemento a porcentagem da área necrosada foi menor (Fig. 4C). Rodrigues *et al.* (2003) verificou que o período de incubação na cultivar BR-Irga-409 quando inoculada com *R. solani* foi de 53 horas.

Às 72 hai, a área necrosada estendeu-se até a posição E dos fragmentos das bainhas de plantas supridas ou não com Si (Fig. 4A, C e D). Nagarajkumar *et al.* (2005) provaram que *R. solani* é capaz de produzir AO em maior quantidade em isolados mais agressivos que isolados menos agressivos, o que pode estar relacionado com a maior severidade da queima das bainhas. Possivelmente o Si dificulta o necrosamento na bainha da planta e/ou ativa mecanismos de resistência que retardam o crescimento da área necrosada. Os pesquisadores Marshall & Rush, (1980) sugeriram que em bainhas de arroz, inoculadas com *R. solani*, duas condições de falhas no processo de infecção são possíveis: a dificuldade de formação de estruturas de infecção e o limitado desenvolvimento de hifas de penetração para continuar a colonização.

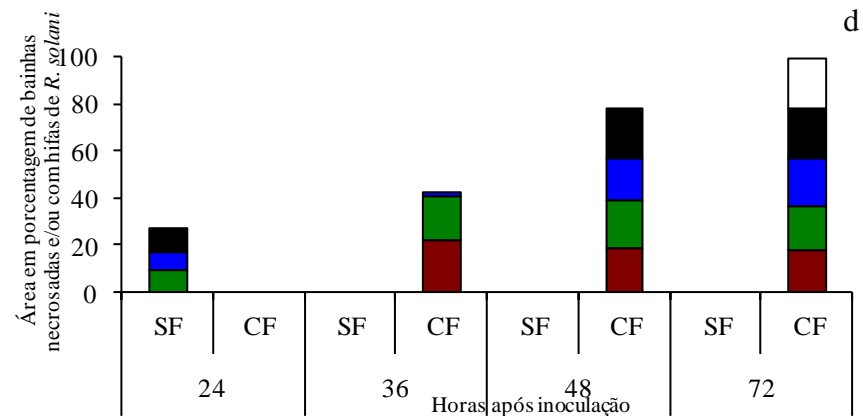
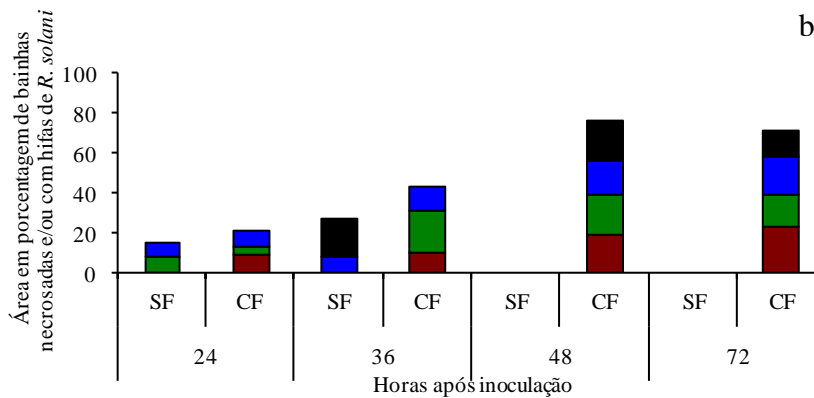
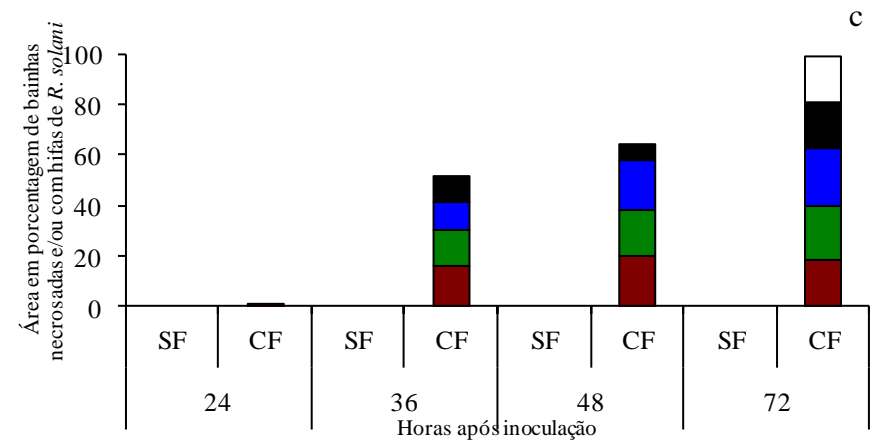
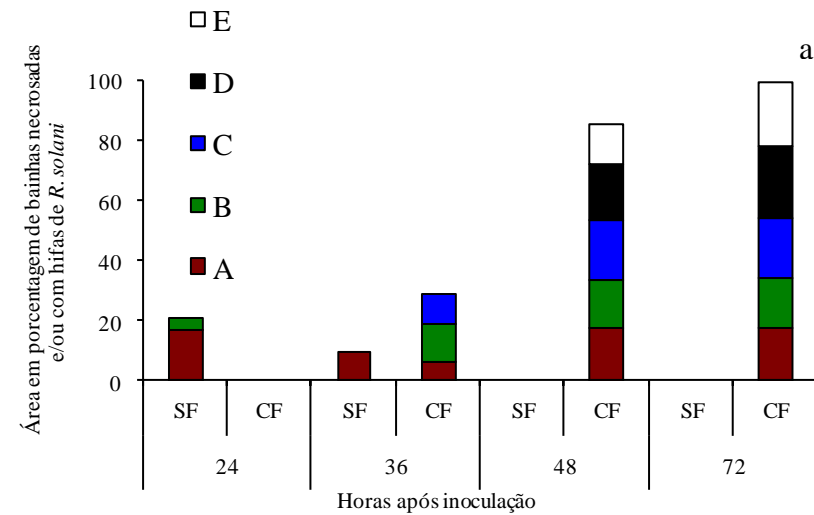


Fig. 4 Área necrosada em bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (a e b) e Labelle (c e d) supridas (b e d) ou não (a e c) com silício. Posição do fragmento (A) 2 cm acima do local de inserção do palito de dente contendo o fungo; Fragmento (B) local de inserção do palito de dente contendo o fungo, ou seja, no local de infecção; Fragmento (C) a 2 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o fungo; Fragmento (D) a 4 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o fungo; Fragmento (E) a 6 cm abaixo do local de inserção do palito de dente contendo o fungo. SF = área da bainha sem crescimento micelial de *R. solani*; CF = área da bainha com crescimento micelial de *R. solani*.

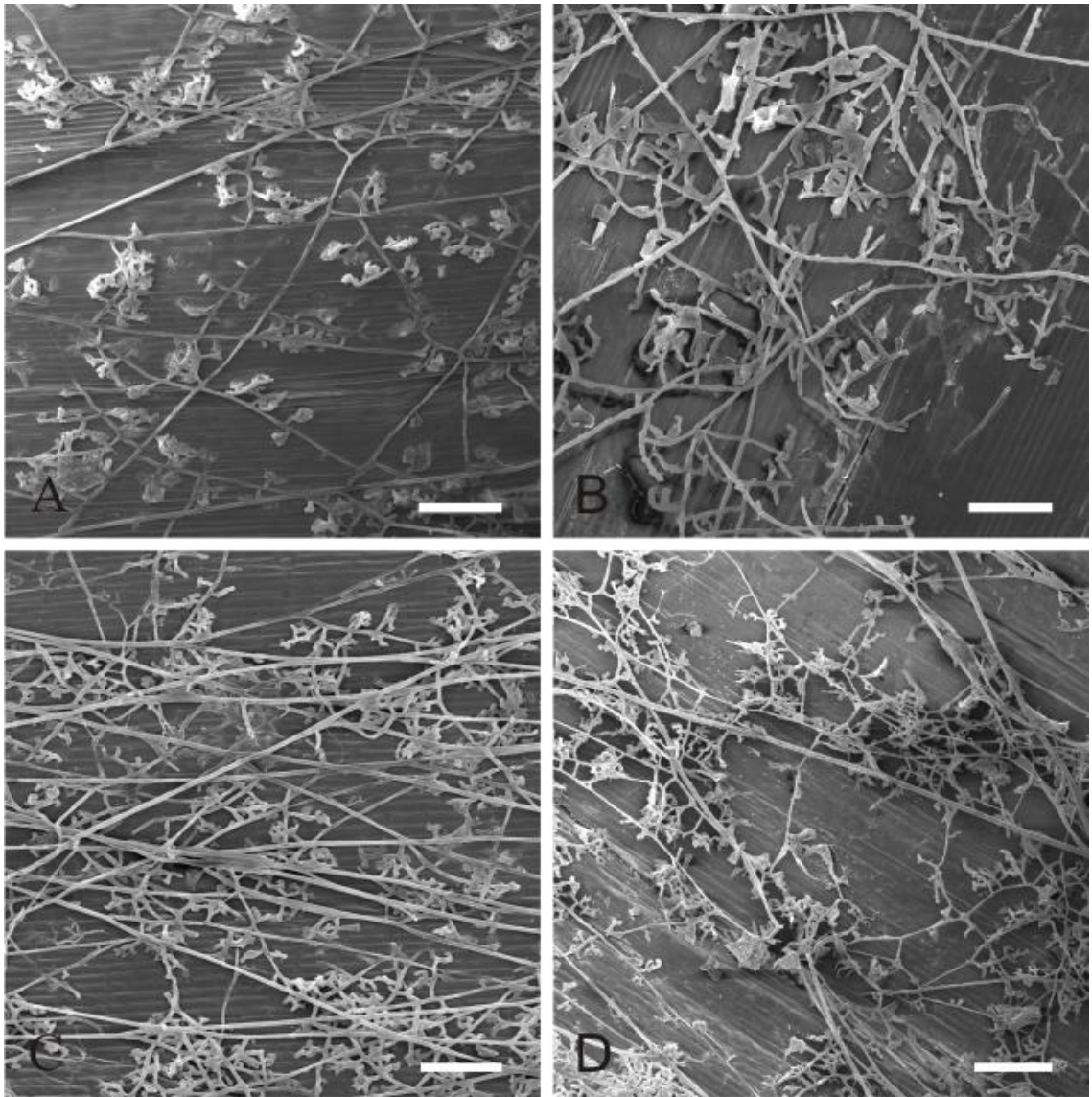


Fig. 5 Microscopia eletrônica de varredura, na superfície abaxial de bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (A e B) e Labelle (C e D) supridas (B e D) ou não (A e C) com silício às 96 horas após a inoculação com *R. solani*. As barras = 200 μ m.

Através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar a formação de almofadas de infecção de *R. solani*, na superfície abaxial das bainhas das plantas de arroz em todos os tratamentos (Fig. 5). As plantas supridas com Si apresentaram um menor crescimento de hifas de *R. solani* sobre o tecido. As bainhas das plantas da cultivar Labelle, supridas ou não com Si, apresentaram uma maior colonização por hifas de *R. solani* em comparação com a cultivar BR-Irga-409.

O Si foi o responsável pelo menor crescimento das hifas de *R. solani* nas bainhas das plantas de arroz supridas com esse elemento. De acordo com Yoshida *et al.* (1962) uma camada espessa de Si é formada entre a cutícula e as células da epiderme, após o

ácido monosilício tornar-se polimerizado. Kim *et al.* (2002) reportou que nas folhas de arroz a dupla camada de Si é parcialmente responsável por impedir a penetração de *Pyricularia grisea*. Estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2003, 2004, 2005) mostraram que o Si foi o responsável por uma maior produção de compostos fenólicos, fitoalexinas e uma maior ativação de alguns genes-PR. Bélanger *et al.* (2003) demonstrou que o Si aplicado em solução nutritiva foi capaz de proteger plantas de trigo contra o fungo *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Liang *et al.* (2005) obtiveram controle de oídio em pepinos com aplicação de Si foliar e via raiz.

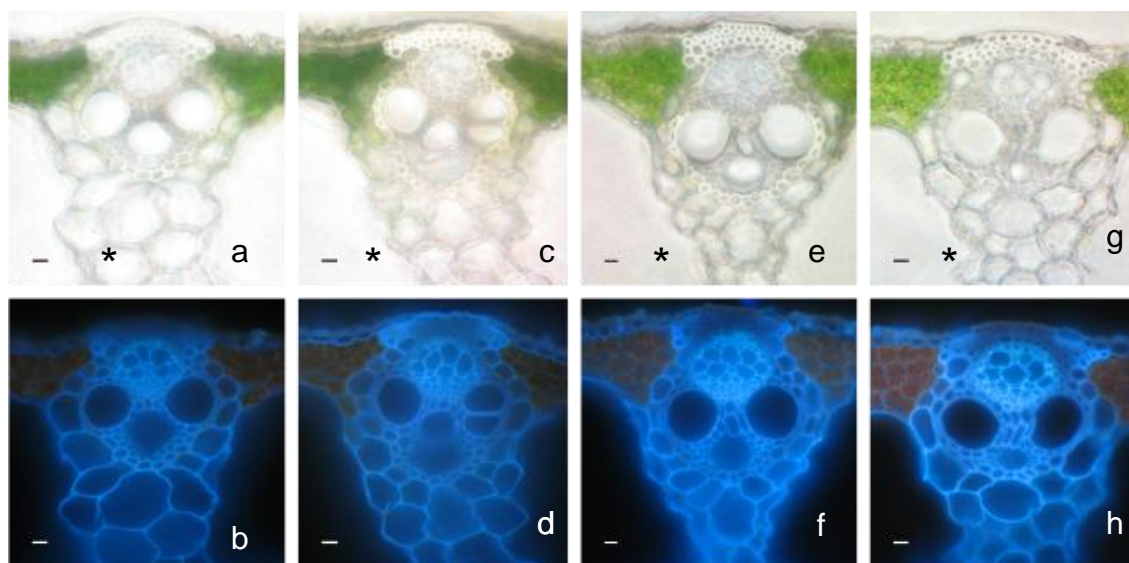


Fig. 6 Microscopia de luz (a, c, e e g) e fluorescência (b, d, f e h) de cortes transversais de bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (a, b, c e d) e Labelle (e, f, g e h) supridas (c, d, g h) e não (a, b, e e f) com silício e não inoculadas com *Rhizoctonia solani*. Os asteriscos correspondem à parte abaxial da bainha. As barras = 10 µm. Os cortes foram observados no aumento de 400 x.

Pela Fig. 6, observou-se que não houve variação na autofluorescência dos cortes transversais de bainhas de plantas das duas cultivares de arroz não inoculadas com *R. solani*, independente da presença/ ausência de Si. A região que autofluoresceu em vermelho indicou uma rica região em cloroplastos. Na Fig. 7, observou-se que os cortes feitos em bainhas de arroz, após 96 hai, apresentaram uma diminuição na proporção e na intensidade da autofluorescência em relação ao material sadio. Nos cortes de bainhas das cultivares BR-Irga-409 e Labelle supridas com +Si constatou-se uma maior intensidade de autofluorescência na epiderme celular como nos feixes vasculares em relação aos cortes de bainhas não supridas com Si. Os cortes das bainhas inoculadas, observadas em microscópio de luz, com campo claro, constatou-se a presença de necrose na parede celular. Estes mesmos cortes sob microscópio de fluorescência observaram-se uma diminuição na autofluorescência nas regiões necrosadas em

comparação aos cortes de bainhas sadias observadas em microscópio de fluorescência. As células da epiderme e do mesófilo autofluoresceram em resposta ao ataque por *P. grisea* (Koga, *et al.*, 1994). A frequência de penetração do fungo *P. grisea* em plantas de arroz supridas com +Si foi menor, contribuindo para uma menor autofluorescência. Em outras palavras, quanto mais fungo no interior do tecido, maior a autofluorescência (Rodrigues *et al.*, 2005).

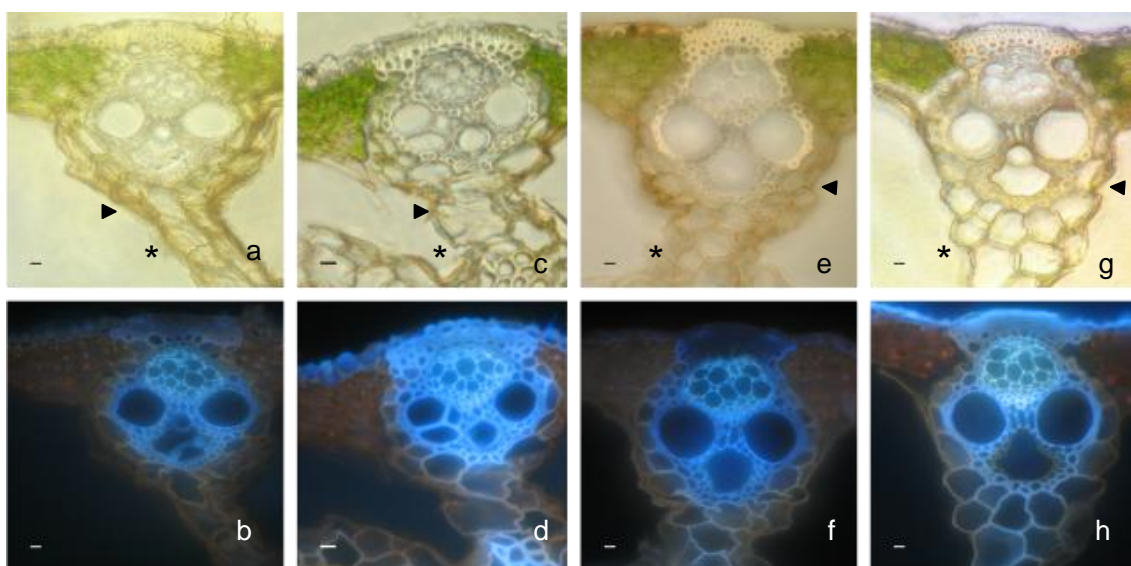


Fig. 7 Microscopia de luz (a, c, e e g) e fluorescência (b, d, f e h) de cortes transversais de bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (a, b, c e d) e Labelle (e, f, g e h) supridas (c, d, g h) e não (a, b, e e f) com silício, às 96 horas após a inoculação com *Rhizoctonia solani*. Os asteriscos correspondem à parte abaxial da bainha. As barras = 10 μ m. Cabeças de setas indicam áreas necrosadas. Os cortes foram observados no aumento de 400 x.

A autofluorescência nas paredes celulares indicou a possível presença de compostos fenólicos. As células da epiderme e parede celular dos cortes de bainhas das duas cultivares não inoculadas apresentaram a cor violeta quando corados com azul de toluidina O. Rodrigues *et al.* (2003) encontraram em cortes de folhas de arroz, corados com azul de toluidina O a 1%, a presença de compostos fenólicos. As células da epiderme e parede celular autofluoresceram quando observados em microscopia de fluorescência. Rémus-Borel *et al.* (2005) encontraram em cortes frescos de plantas de trigo supridas com +Si uma intensa fluorescência amarela em células da epiderme, e em plantas não supridas com Si não se encontrou essa fluorescência. Os autores sugeriram que a fluorescência amarela produzida pela planta é o acúmulo de metabólito fungitóxico, com padrão típico de fitoalexinas.

As plantas de arroz, supridas com silício, reduziram o CRL da queima das bainhas, apresentaram menor crescimento superficial de hifas de *R. solani* em bainhas

de arroz, uma menor área necrosada pelo patógeno e uma maior intensidade de autofluorescência em cortes transversais de bainhas de arroz.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bélanger RR, Benhamou N, Menzies JG. (2003) Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology* 93:402-412.

Carver TLW, Robbins MP, Thomas BJ, Troth K, Raistrick N, Zeyen R J. (1998) Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52:245-257.

Cunningham JL. (1972) A miracle mounting fluid for permanent wholemounts of microfungi. *Mycologia* 64:906-911.

Dallagnol LJ, Rodrigues FÁ, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* 99:116-121.

Datnoff LE, Deren CW, Snyder GH. (1997) Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Protection* 16:525-531.

Guével MH, Menzies JG, Bélanger RR. (2007) Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. *European Journal of Plant Pathology* 119:429-436.

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.

Koga H. (1994) Hypersensitive death, autofluorescence and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near isogenic lines of rice (Pi-Zt) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. *Canadian Journal of Botany* 72:1463-1477.

Li Z, Pinson SRM, Marchetti MA, Stansel JW, Park WD. (1995) Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theoretical and Applied of Genetics* 91:382-388.

- Liang YC, Sun WC, Si J. (2005) Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology* 54:678-685.
- Liberato JR. (2003) Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análise de imagens. Viçosa, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130:2111-2117.
- Ma JF. (2004) Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition* 50:11-18.
- Ma JF, Yamaji N. (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science* 11:392-397.
- Marshall DS, Rush MC. (1980) Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:947-950.
- Menzies JG, Ehret DL, Glass ADM, Samuels AL. (1991) The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:403-414.
- Nagarajkumar M, Jayaraj J, Muthukrishnan S, Bhaskaran R, Velazhahan R. (2005) Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* *Microbiological Research* 160:291-298.
- Ou SH (1985) *Rice Diseases*. 2nd Ed. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 380 p.
- Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR. (2005) Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:108-115.
- Rezende DC, Rodrigues FÁ, Carré-Missio V, Schurt DA, Kawamura IK, Korndörfer GH. (2009) Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. *Australasian Plant Pathology* 38:67-73.
- Rodrigues FÁ, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC. (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Diseases* 85:827-832.
- Rodrigues FÁ, Vale FXR, Korndörfer GH, Datnoff LE, Oliveira AM, Zambolim L. (2003a) Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection* 22:23-29.

- Rodrigues FÁ, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Bélanger RR. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93:535-546.
- Rodrigues FÁ, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94:177-183.
- Rodrigues FÁ, 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.
- Smith VL, Punja ZK, Jenkins SF. (1986) A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 76:755-759.
- Vidhyasekaran P, Onmalar TR, Samiyappan R, Velazhahan R, Vimala R, Ramanathan A, Paranidharan V, Muthkrishnan S. (1997) Host-specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology* 87:1258-1263.
- Yoshida S, Ohnishi Y, Kitagishi, K. (1962) Histochemistry of Si in rice tissues. III. The presence of cuticle-silica double layer in the epidermal tissue. *Soil Science and Plant Nutrition* 8:1-5.
- Zeyen RJ, Ahlstrand GG, Carver TLW. (1993) X-ray microanalysis of frozen hydrated, freeze-dried, and critical point dried leaf specimens: Determination of soluble and insoluble chemical elements at *Erysiphe graminis* epidermal cell papilla sites in barley isolines containing *Ml-o* and *ml-o* alleles. *Canadian Journal of Botany* 71:284-296.
- Winslow MD. (1992) Silicon, disease resistance, and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. *Crop Science* 32:1208-1213.

Capítulo 4

Produtos derivados da pirólise de bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, e infectadas por *Rhizoctonia solani*

RESUMO

Produtos derivados da pirólise de bainhas de plantas de arroz, supridas ou não com silício, e infectadas por *Rhizoctonia solani*

O arroz é umas das mais importantes fontes de carboidratos para a população de vários países. A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma das principais doenças da cultura do arroz. O objetivo do trabalho foi elucidar através da análise de pirólise (Pi) combinado com cromatografia gasosa (CG)/espectrometria de massa (EM), o efeito do silício em possíveis alterações na composição química da lignina em bainha de plantas de arroz, quando infectadas por *R. solani*. As melhores temperaturas para pirólise de bainhas de arroz foram às de 500 e 550°C. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os dados da literatura, permitindo a identificação de 33 compostos, dos quais 10 corresponderam a produtos da degradação de carboidratos, enquanto 23 foram derivados da lignina. Dos derivados de lignina 8 compostos tiveram origem do tipo *p*-hidroxifenila, 11 compostos do tipo guaiacila e 4 do tipo siringila. Utilizando-se a metodologia Pi-CG-EM, foi encontrado na bainha das plantas de arroz, supridas ou não com Si, aproximadamente 15% de lignina sendo a soma dos derivados da lignina do tipo *p*-hidroxifenila, do tipo guaiacila e do tipo siringila. No presente estudo foi encontrado nas bainhas infectadas das plantas das duas cultivares, supridas ou não com Si, um aumento na relação S/G, exceto para cultivar BR-Irga-409 suprida com Si. Isso mostra uma possível reação de defesa da planta à infecção por *R. solani*. A adição de Si na solução nutritiva reduziu significativamente a AACPEL da queima-das-bainhas, deixando à planta mais resistente a infecção.

Palavras chaves: Controle de doenças, nutrição mineral, *p*-hidroxifenila, guaiacila, siringila, queima das bainhas e lignina.

ABSTRACT

Products derived from pyrolysis sheaths of rice plants, supplied or not with silicon and infected by *Rhizoctonia solani*

Rice is one of the most important sources of carbohydrates for the population of many countries. The sheaths blight, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn is a major disease of rice. The objective was to elucidate through the analysis of pyrolysis (Py) combined with gas chromatography (GC) mass spectrometry (MS), the effect of silicon on possible changes in the chemical composition of lignin in the sheath of rice plants, when infected *R. solani*. The best temperatures for pyrolysis of rice sheaths were at 500 and 550° C. Mass spectra were compared with literature data, allowing the identification of 33 compounds, of which 10 corresponded to degradation products of carbohydrates, while 23 were derived from lignin. Of the eight lignin-derived compounds type originated from p-hydroxyphenyl, guaiacyl-type compounds 11 and 4 type syringyl. Using the methodology Pi-GC-MS, was found in the sheath of rice plants, supplied or not with Si, about 15% lignin being the sum of the lignin derivatives like p-hydroxyphenyl, guaiacyl type and type syringyl. In the present study was found in the sheaths of infected plants of both cultivars, or not supplied with Si, an increase in S / G, except for Br-Irga-409 supplied with Si. This shows a possible reaction to the plant defense infection by *R. solani*. The addition of Si in the nutrient solution significantly reduced the blights AACPEL-of-sheaths, leaving the plant more resistant to infection.

Keywords: Control of diseases, nutrition, p-hydroxyphenyl, guaiacyl, syringyl, blight of sheaths and lignin.

1. INTRODUÇÃO

O arroz [*Oryza sativa* L.] é umas das mais importantes fontes de carboidrato para a população de vários países (Greenland, 1997). Vários são os fatores que afetam a produção mundial de arroz, entre elas a ocorrência de doenças. Entre as doenças de fúngicas que acometem a cultura do arroz, a queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn (Hashiba & Kobayashi, 1996), é uma das mais importantes. Devido a ausência de cultivares de arroz resistentes à queima das bainhas (Li *et al.*, 1995), a utilização de fungicidas é o principal método de controle empregado atualmente (Groth *et al.*, 1990; Rush & Lee, 1992). Entretanto, preocupações com meio ambiente, saúde pública, custo das aplicações e a resistência do fungo aos fungicidas tem estimulado cada vez mais os pesquisadores a buscarem métodos alternativos para controlar as principais doenças do arroz.

O silício (Si) aumenta a resistência do arroz à várias doenças como a brusone, a queima das bainhas, a mancha parda e a escaldadura (Datnoff *et al.*, 2007). Rodrigues *et al.* (2001) demonstraram que cultivares de arroz supridas com Si apresentaram redução na severidade da queima das bainhas. Os mecanismos pelos quais o Si confere resistência às plantas de arroz a infecção por *R. solani* ainda não foram investigados. Entretanto, é possível que a resistência do arroz à essa doença conferida pelo Si ocorra através da ativação de algum mecanismo de defesa. Rodrigues *et al.* (2003, 2004) ao estudarem o efeito do Si na resistência do arroz à brusone, verificaram por meio de evidências citológicas de que o aumento na resistência foi devido ao acúmulo de compostos fenólicos e de fitoalexinas. Trabalhos na literatura demonstram que a aplicação de Si pode potencializar a produção de compostos fenólicos em pepino e trigo, os quais garantem uma maior resistência das plantas ao oídio (Menzies *et al.*, 1991; Bélanger *et al.*, 2003). O Si pode estar associado a um complexo lignina-carboidrato na parede celular das plantas de arroz (Inanaga *et al.*, 1995), o qual tem um importante papel na resistência das plantas às doenças.

Nas espécies vegetais, em geral, a lignina está presente na parede celular e na lamela média dos tecidos em uma concentração que pode variar de 10 a 30% (Hon & Shiraishi, 2001). A lignina é essencial para planta, pois fortalece a parede celular, facilita o transporte de água e previne a degradação dos tecidos por patógenos, insetos e herbívoros (Hatfield & Vermerris, 2001). A lignina é um polímero fenólico, de natureza

complexa, amorfo e aromático (Meier & Faix, 1992) a qual é sintetizada nas plantas pela condensação desidrogenativa dos álcoois cinâmicos, a partir da polimerização natural dos monômeros de fenilpropanóides (Meier & Faix, 1992). A biossíntese da lignina nas plantas inicia-se pela rota dos fenilpropanoídes, a partir da conversão do aminoácido fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico pela enzima fenilalanina-amônia-liase (Jones, 1984). Nessa rota, forma-se os álcoois *p*-cumarílico (lignina *p*-hidroxifenila), coniferílico (lignina guaiacila) e sinapílico (lignina siringila), que são os precursores da lignina (Fengel & Wegner, 1983). A constituição da lignina das gramíneas é diferente da lignina da madeira. As gramíneas contêm uma fração substancial de ácido ferúlico e *p*-coumarílico (Harris & Hartley, 1980) e quantidades elevadas de unidades de *p*-hidroxifenila, o qual é resultado da inclusão do álcool *p*-coumarílico junto ao álcool coniferílico e sinapílico (Harris & Hartley, 1980). Este conjunto de monômeros com radicais livres facilita a polimerização da lignina na parede das células (Sarkanen & Ludwig, 1971). Higuchi (1990) demonstrou que na lignina das gramíneas ocorre a presença simultânea das unidades de *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila, associadas com o ácido hidroxicinâmico. Essas associações ocorrem através de pontes éster e éter, formando o complexo lignina/fenólica-carboidrato (Sun *et al.*, 2002). Em função desta natureza química complexa, a lignina é praticamente impossível quando extraída na forma pura. A caracterização de materiais complexos de lignocelulose é uma das limitações nas metodologias analíticas atuais.

A pirólise analítica é uma técnica rápida para analisar materiais lignificados, mesmo que a cadeia de unidades da lignina seja alterada, pois os grupos de anéis aromáticos permanecem inalterados (Boon, 1989). O termo pirólise significa ruptura de ligações químicas usando apenas energia térmica. A pirólise compreende o aquecimento da amostra em um ambiente inerte no qual os componentes da matriz são fragmentados. O pirolizador (Pi) é acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG) juntamente com um espectrômetro de massa (EM). O CG auxilia na separação dos componentes e o EM detecta os componentes da amostra. A lignina, após pirolizada, constitui-se numa mistura relativamente simples de fenóis, os quais resultam de uma clivagem de éter e certas ligações carbono-carbono. Muitos destes fenóis conservam suas substituições padrões do polímero de lignina, sendo possível identificar *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Ralph & Hatfield, 1991). Embora a característica química da lignina das madeiras seja bem investigada, estudos sobre a estrutura das propriedades da lignina das gramíneas é ainda escassa (Buranov & Mazza, 2008). A composição química da lignina

da palha de gramíneas não é bem conhecida, bem como as inter-relações dessa com os componentes da parede celular (Scalbert *et al.*, 1986).

Este trabalho teve como objetivo elucidar, através da análise de pirólise, o efeito do Si na possível alteração da composição química da lignina da bainha de plantas de arroz quando infectadas por *R. solani*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento das plantas

Sementes de arroz das cultivares Labelle (*japônica*) e BR-Irga-409 (*indica*) foram germinadas em rolos de papel filtro embebidos com água e mantidos a 25°C. Após a germinação, as plântulas foram mantidas por dois dias em solução nutritiva com a metade da concentração, sem adição de Si. As plântulas foram crescidas em vasos com volume de 0,5 l de solução nutritiva modificado de Hoagland & Arnon (1950), a qual era composta dos seguintes nutrientes: 1 mol.L⁻¹ KNO₃; 0,25 mol.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mol.L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mol.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 mol.L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,3 mmol.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 mmol.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 mmol.L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 mmol.L⁻¹ MnCl₃.4H₂O; 0,014 mmol.L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 mmol.L⁻¹ Na₂EDTA e 25 mmol.L⁻¹ FeSO₃. Para o preparo da solução nutritiva, utilizou-se 1 ml de cada nutriente para cada 9 ml de água deionizada. Plantas crescidas em solução nutritiva sem a adição de ácido monossilícico serviram como controle. As plantas foram supridas com Si, adicionando-se à solução nutritiva o ácido monossilícico até a concentração final de 2 mmol/l. O ácido monossilícico foi obtido pela passagem do silicato de potássio (4,5 ml/l de água) através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite-120, Fluka) (Ma *et al.*, 2002). A solução nutritiva foi trocada a cada 4 dias e o pH foi verificado a cada dois dias e mantido na faixa de 5,5 a 6. As plantas foram crescidas em solução nutritiva, com ou sem Si, com a concentração descrita anteriormente até os 30 dias após o transplante e aumentou essa concentração para 1,5 vezes até o máximo perfilhamento (60 dias).

2.3. Produção do inoculo, inoculações e avaliações

As plantas foram inoculadas com o fungo *R. solani* no estágio de máximo perfilhamento utilizando-se o isolado *Rs-1* de *R. solani* AG1-1A cedido pelo Dr. Anne Sitarama Prabhu da (CNPAP). O fungo foi crescido em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e discos do meio contendo micélio do fungo foram retirados e distribuídos em novas placas de Petri contendo BDA, o qual continha na superfície do meio, pedaços de palito de dente de 1 cm de comprimento. Os palitos de dente foram lavados em água quente para a retirada de possíveis substâncias tóxicas. Posteriormente, os pedaços de palito de dente foram misturados ao BDA e esterilizados em autoclave por 20 min antes de serem transferidos para novas placas de Petri. Os pedaços de palito com BDA serviram como suporte para crescimento do fungo. As placas foram transferidas para câmara de crescimento (25°C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro) onde permaneceram por 5 dias. Pedaços de palitos de dente contendo o fungo foram transferidos, com auxílio de uma pinça estéril, para a segunda bainha do perfilho principal de cada planta. A bainha foi amarrada no colmo com um fitilho para garantir o contato com o fungo. Plantas que receberam o palito de dente sem o fungo serviram como controle.

Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de 25°C e umidade relativa de 95%. Avaliou-se o comprimento da lesão da queima das bainhas em cada bainha inoculada às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) com auxílio de um paquímetro digital. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o comprimento relativo da lesão (CRL) de acordo com a seguinte fórmula: comprimento da lesão na bainha (mm) / comprimento total da bainha (mm) x 100. Os dados do CRL foram utilizados para obter a área abaixo da curva do progresso do comprimento relativo da lesão (AACPCRL) pela integração trapezoidal das curvas de progresso de acordo com Shaner & Finney (1977).

2.4. Preparo das amostras para pirólise e quantificação dos derivados de carboidratos e da lignina

As bainhas das plantas coletadas às 120 hai e também das plantas não inoculadas com *R. solani* das repetições de cada tratamento foram rapidamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C. As amostras das bainhas foram liofilizadas, moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) e o pó fino obtido foi passado em peneira de 40 mesh. O pó obtido de cada amostra de bainha (aproximadamente 100 µg) foi colocado em cadinho de platina e pirolisado nas

temperaturas de 300, 400, 500, 550 e 600°C por 10 seg. Para pirolisar, utilizou-se um microforno vertical (PYR-4A Shimadzu) acoplado a um cromatógrafo a gás e espectrômetro de massa Pi-CG-EM (PQ5050A, Shimadzu). Os produtos da pirólise foram automaticamente injetados no cromatógrafo utilizando-se como gás de arraste o hélio, na razão de fluxo de 1 ml/min e split 1/10 e o fluxômetro eletrônico modelo Veri-Flow 500 (Agilent). Para a separação dos compostos obtidos, utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de filme). A temperatura inicial da coluna foi de 45°C por 4 min aumentando de 45 até 240°C na taxa de 4°C min⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 10 min. A temperatura do detector foi de 250°C e na interface CG-EM de 290°C. O detector de massas operou por ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas no intervalo de m/z 40 a 400. Os compostos foram identificados através da comparação dos espectros de massas das amostras com o banco de dados contidos no software do aparelho (Wiley, 7^a edição), utilizando-se o modo de fragmentação das moléculas e a comparação com a literatura. A quantificação dos derivados de carboidratos e da lignina foi baseada nas áreas dos picos obtidos, cuja soma correspondeu a 100%. A porcentagem da área dos derivados de lignina tais como *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila correspondeu ao somatório das áreas das unidades destes três derivados. A área dos derivados totais da lignina foi o somatório das áreas dos derivados de lignina tais como *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila. A relação siringila/guaiacila (S/G) foi determinada pela razão dos somatórios das áreas relativas aos sinais correspondentes às estruturas siringila e guaiacila.

2.5. Determinação de Silício

A concentração de Si nas bainhas das plantas supridas ou não com Si foi determinada pelo método colorimétrico (Korndörfer *et al.*, 2004). Os pedaços de bainhas foram coletados às 120 hai das plantas das repetições de cada tratamento, secos em estufas a 65°C até atingir peso constante, moídos em moinho tipo Thomas-Wiley e o pó obtido passado em peneira de 40 mesh.

2.6. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 com 15 repetições. Os fatores estudados foram: duas cultivares de

arroz e presença (+Si) ou ausência (-Si) de Si na solução nutritiva. Cada repetição correspondeu a um vaso plástico contendo 2 plantas de arroz. Para as amostras pirolizadas, das 15 repetições de cada tratamento obteve-se 3 amostras compostas para pirolização. Os dados da AACPCRL e da concentração de Si foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados da análise de pirólise foram interpretados qualitativamente.

3. RESULTADOS & DISCUSSÃO

A concentração de Si nas bainhas das plantas das cultivares BR-Irga 409 e Labelle, supridas com Si, foi 2,9 e 2,5%, respectivamente, mas sem diferença significativa entre elas ($P > 0,05$). Já para as bainhas das plantas das cultivares BR-Irga 409 e Labelle não supridas com Si, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações de Si, as quais foram, respectivamente, de 0,5 e 0,4%. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para a concentração de Si nas bainhas das plantas supridas com Si em comparação com as plantas não supridas com esse elemento. Rodrigues *et al.* (2001) obtiveram um aumento de 80% para a concentração de Si nas bainhas das plantas de seis cultivares de arroz suscetíveis a queima das bainhas. As gramíneas de ambiente aquático, a exemplo do arroz, acumulam acima de 5% de Si na matéria seca (Epstein, 1994).

Não houve diferença estatística entre as plantas das cultivares Labelle e BR-Irga-409 não supridas com Si quanto a AACPCRL (Tabela 1). As plantas da cultivar Labelle supridas com Si, ao contrário das plantas da cultivar BR-Irga 409 supridas com Si, foram mais resistentes à queima das bainhas (Tabela 1). Plantas de arroz crescidas na presença de Si apresentaram uma redução significativa na AACPCRL da queima das bainhas em 19 e 25%, respectivamente, nas bainhas da cultivar BR-Irga-409 e Labelle em relação às bainhas das plantas não supridas com o elemento (Tabela 1). As bainhas das plantas da cultivar Labelle supridas com Si apresentaram uma redução de 17% na AACPCRL em relação a cultivar BR-Irga 409 suprida com Si. Rodrigues *et al.* (2001) encontraram uma redução de 62% na área abaixo da curva do progresso da extensão da lesão da queima das bainhas em plantas supridas com Si. Winslow *et al.* (1992) reportou que o Si somente reduziu a severidade da queima das bainhas nos genótipos de arroz irrigado do tipo *indica*. Entretanto, Rodrigues *et al.* (2001) demonstraram que

cultivares de arroz do tipo *índica* quanto *japônica*, supridas com Si, apresentaram uma redução na severidade da queima das bainhas.

Tabela 1. Área abaixo da curva do progresso do comprimento relativo da lesão (AACPCRL) da queima das bainhas nas bainhas das plantas das cultivares BR-Irga 409 e Labelle, supridas (+Si) ou não (-Si) com silício em solução nutritiva.

Cultivares	AACPCRL	
	-Si	+Si
Labelle	2632 aA	1968 bB
BR-Irga-409	2938 aA	2378 aB

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Realizou-se a pirólise do pó das bainhas das plantas de arroz apenas da cultivar BR-Irga-409 não supridas com Si nas temperaturas de 300, 400, 500, 550 e 600°C com o objetivo de escolher a temperatura na qual ocorreu a melhor pirolização das amostras (Fig. 1). As melhores temperaturas para pirólise foram as de 500 e 550°C em razão da maior quantidade de compostos obtidos (Fig. 1). Nos espectros de massas, os derivados da lignina forneceram íons moleculares intensos de até 100%. Os carboidratos foram facilmente fragmentados no impacto eletrônico, formando íons de baixa massa molecular e, conseqüentemente, de difícil identificação.

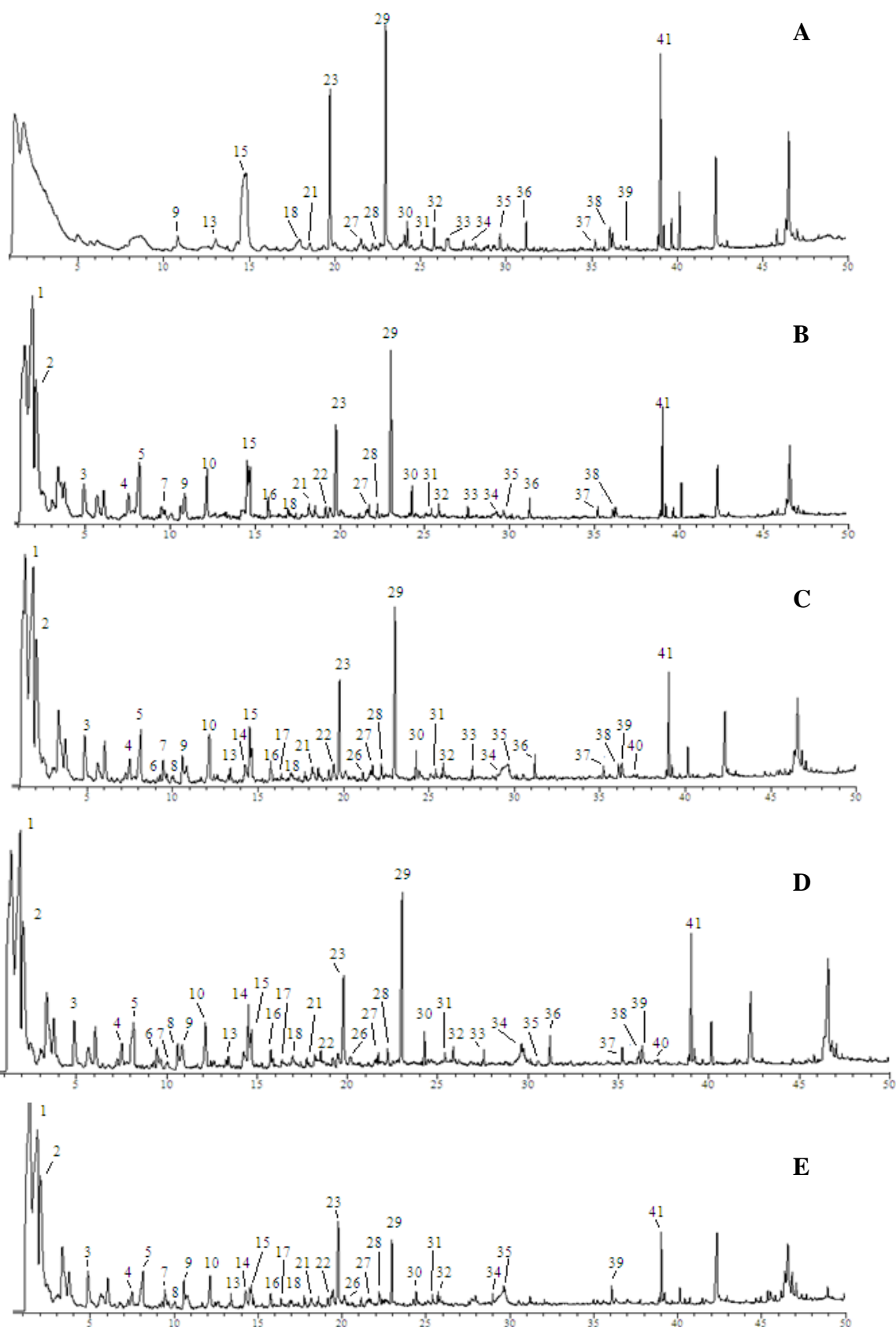


Figura 1. Pirogramas do pó das bainhas de plantas de arroz da cultivar BR-Irga-409 não supridas com silício. As amostras foram pirolizadas nas temperaturas de 300 (A), 400 (B), 500 (C), 550 (D) e 600°C (E). Os números para os picos em cada pirograma referem-se ao tempo de retenção, em minutos, dos compostos na coluna.

A comparação dos espectros de massa obtidos da pirolização das bainhas das plantas das cultivares BR-Irga-409 e Labelle supridas ou não com silício e inoculadas ou não com *Rhizoctonia solani* (Fig. 2) com os dados da literatura permitiu a identificação de 33 compostos, os quais estão representados na Tabela 2. A análise desses compostos permitiu separá-los em 10 compostos originados da degradação de carboidratos e 23 derivados da lignina. Dos 23 compostos, 8 tiveram origem do tipo *p*-hidroxifenila, 11 do tipo guaiacila e 4 do tipo siringila. Alguns compostos não foram identificados devido à baixa resolução dos seus espectros de massas. De acordo com Kuroda *et al.* (1995), amostras de bainhas de arroz pirolizadas a 500°C durante 4 seg, permitiu a identificação de 16 compostos, dos quais 5 tiveram origem do tipo *p*-hidroxifenila, 6 do tipo guaiacila e 5 do tipo siringila.

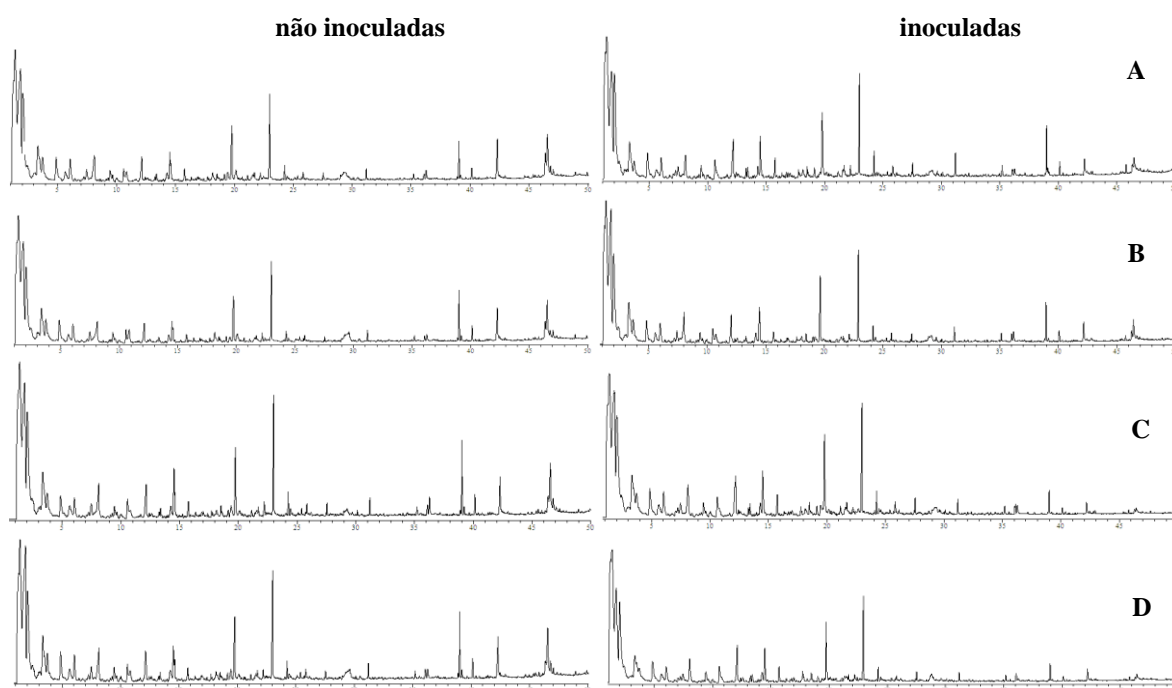


Figura. 2. Pirogramas do pó das bainhas obtidas das plantas das cultivares BR-Irga 409 (A e B) e Labelle (C e D) inoculadas (120 h) ou não inoculadas com *Rhizoctonia solani* e supridas (B e D) ou não (A e C) com silício em solução nutritiva.

Tabela 2. Principais compostos de natureza fenólica identificados por Pi-CG-EM nas bainhas das plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 e Labelle supridas (+Si) ou não (-Si) com silício. As bainhas foram coletadas de plantas inoculadas com *Rhizoctonia solani* às 120 h e de plantas não inoculadas.

Picos*	TR**	Nome do composto	Área relativa (%)								Origem***
			Labelle				BR-Irga 409				
			Não inoculadas		Inoculadas		Não inoculadas		inoculadas		
+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si				
1	1,26	N.I.	8,64	10,06	15,24	10,09	11,44	9,44	11,28	14,06	/
2	1,37	Ácido acético	14,50	16,23	18,50	16,23	18,61	17,27	18,01	19,87	C
3	4,84	Furfuroi	1,83	1,37	1,84	1,91	2,02	1,71	1,93	1,73	C
4	7,46	Furan-2(5H)-ona	0,82	0,95	0,70	0,80	0,68	0,71	0,73	0,67	C
5	8,09	Furan-2(2H)-ona	1,86	2,22	2,17	2,29	1,83	1,81	2,24	1,78	C
6	9,02	Furan-2,6(3H,4H)-dione	0,70	0,68	0,80	0,73	0,10	0,10	0,14	0,24	C
7	9,53	3-Furanona	0,33	0,30	0,24	0,24	0,79	0,49	0,76	0,54	C
8	9,94	4-Metil-2(5H)-furanona	0,14	0,14	0,12	0,16	-	-	-	-	C
9	10,55	Monofenol	0,83	0,73	1,17	1,19	1,01	0,88	1,09	1,03	LH
10	12,12	2-hidroxil-3-metil-2-ciclopenteno-1-ona	1,74	1,70	1,79	2,28	1,12	1,45	1,95	2,16	C
11	13,34	2-Metilfenol	0,25	0,27	0,31	0,18	0,15	0,27	0,27	0,30	LG
12	14,09	4-Metilfenol	0,71	0,62	0,36	0,40	0,77	0,51	0,83	0,58	LG
13	14,49	Guaiaicol	1,49	2,12	2,09	2,13	1,15	1,46	1,99	2,31	LG
14	15,71	6-diidro-metil-2H-piran-3(4H)-ona	0,49	0,52	0,69	0,70	0,48	0,54	0,60	0,66	C
15	16,81	Valerolactona	0,05	0,17	0,18	0,14	0,12	0,15	0,19	0,19	/
16	16,90	3,5-dimetilfenol	0,22	0,12	0,17	0,13	0,12	0,15	0,17	0,24	LH
17	16,98	2,6-dimetilfenol	-	-	-	-	0,17	0,14	0,13	0,14	LH
18	17,68	4-etilfenol	-	-	-	-	0,16	0,12	0,20	0,19	LH
19	17,78	3-etilfenol	0,15	0,14	0,36	0,22	0,09	0,08	0,13	0,24	LH
20	18,45	4-metilguaiaicol	0,19	0,30	0,30	0,36	0,36	0,18	0,29	0,23	LG
21	19,34	Pirocatecol	0,66	0,67	0,21	0,77	0,47	0,70	0,46	0,35	LG
22	19,69	Ácido 4-coumárico	-	-	-	-	3,13	2,61	3,81	3,29	LH
23	20,15	3-Isopropilfenol	-	-	-	-	0,09	0,64	-	0,07	LH
24	21,11	3-metil-pirocatecol	0,12	0,22	0,40	0,31	0,12	0,20	0,19	0,16	LG
25	21,68	4-etilguaiaicol	0,20	0,21	0,18	0,30	0,17	0,21	0,22	0,21	LG
26	22,18	2,3-benzopireole	0,29	0,42	0,30	0,19	0,29	0,25	0,29	0,23	/
27	22,97	4-etil-2-metoxil-fenol	4,12	3,97	3,51	3,88	3,78	3,48	3,75	3,89	LH
28	24,22	Siringol	0,54	0,63	0,54	0,66	0,41	0,54	0,55	0,66	LS
29	25,38	3-metil-indole	0,15	0,16	0,09	0,08	-	-	-	-	/
30	25,80	Vanilina	0,29	0,32	0,20	0,44	0,24	0,25	0,30	0,26	LG
31	27,43	Metilsiringol	0,06	0,06	0,07	0,10	0,05	0,07	0,08	0,12	LS
32	27,52	Isoeugenol	0,26	0,35	0,29	0,43	0,19	0,29	0,31	0,35	LG
33	28,93	Levoglicosano	0,14	0,05	0,76	0,06	0,07	0,42	0,31	0,28	C
34	29,56	2,4-di-tert-butilphenol	0,15	0,20	0,10	0,13	0,09	0,15	0,14	0,13	/
35	34,00	Siringaldeido	0,04	0,06	0,04	0,06	-	-	-	-	LS
36	35,18	Metoxieugenol	0,27	0,22	0,20	0,23	0,22	0,21	0,24	0,26	LG
37	36,06	Acetosiringol	0,27	0,43	0,37	0,43	0,28	0,27	0,27	0,25	LS
38	36,23	Álcool coniferílico	0,39	0,67	0,27	0,59	0,36	0,46	0,37	0,37	LG
39	38,99	Neofitodieno	1,92	1,96	0,60	0,70	1,91	1,22	1,06	1,15	/
Área dos derivados de carboidratos (%)			22,56	24,17	27,61	25,40	25,70	24,50	26,68	27,93	
Lignina tipo <i>p</i> -hidroxifenila (%)			5,31	4,96	5,20	5,42	8,54	8,10	9,28	9,09	
Lignina tipo guaiacila (%)			4,83	5,97	4,81	6,13	4,22	4,76	5,48	5,39	
Lignina tipo siringila (%)			0,90	1,18	1,03	1,24	0,74	0,88	0,91	1,03	
Área dos derivados totais de lignina (%)			11,04	12,11	11,04	12,79	13,50	13,74	15,66	15,51	

* O número do pico refere-se aos sinais designados na Figura 1D. ** tempo de retenção, em minutos, do composto na coluna. *** Origem do composto. N.I.: composto não identificado. C: carboidratos. LH: lignina *p*-hidroxifenila. LG: lignina guaiacila. LS: lignina siringila. - = composto não detectado. / = composto não determinado.

Alguns compostos não foram identificados para as cultivares BR-Irga 409 e Labelle nas amostras pirolizadas. Ao analisar os compostos obtidos (Tabela 2), três deles (4-metil-2(5H)-furanona, 3-metil-indole e siringaldeído) foram encontrados nas bainhas das plantas da cultivar Labelle, mas estiveram ausentes para a cultivar BR-Irga 409. Já nas análises da cultivar BR-Irga-409, encontramos quatro compostos (2,6-dimetilfenol, 4-etilfenol, ácido *p*-coumárico e 3-isopropilfenol) que não foram encontrados na cultivar Labelle. Sabe-se que o colmo do arroz é de composição química heterogênea, complexa e difere em função da parte da planta analisada (Jin & Chen, 2006) e da cultivar de arroz (Summers *et al.*, 2003).

No presente estudo, utilizando a metodologia Pi-CG-EM, foi encontrado nas bainhas das plantas de arroz, supridas ou não com Si, uma faixa de 4,9 a 9,2% da área de derivados de lignina do tipo *p*-hidroxifenila; na faixa de 4,2 a 6,1% da área de derivados de lignina do tipo guaiacila e na faixa de 0,7 a 1,1% da área de derivados de lignina do tipo siringila. A soma das áreas dos derivados da lignina dos tipos *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila foi de aproximadamente 15%. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Deng *et al.* (2007), os quais encontraram aproximadamente 18% de lignina no colmo do arroz.

A lignina da bainha do arroz continha unidades de *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila nas proporções de 56, 37 e 7%, respectivamente. De acordo com Lapiere *et al.* (1993), as proporções das unidades *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila foram, respectivamente, de 15, 45 e 40%, no colmo de plantas de arroz. Tais variações em proporções podem ser atribuídas às diferentes metodologias empregadas, estágios de crescimento da planta e a parte da planta analisada. As composições dos monômeros de lignina podem variar entre espécies de plantas, tipo de tecido e das condições fisiológicas dos tecidos da planta amostrada (Lewis & Yamamoto, 1990). A lignina do tipo siringila é a mais reativa; assim a deslignificação de madeiras com alta relação siringila/guaiacila é mais fácil de ocorrer (Tsutsumi *et al.* 1995).

No presente estudo, houve um aumento na relação S/G, exceto para as bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409 supridas com Si (Tabela 3), o que pode representar uma possível reação de defesa da planta à infecção por *R. solani*. Ride (1995) mostrou que durante a maturação das gramíneas, o conteúdo de siringila aumenta, deixando às plantas mais resistentes à infecção por patógenos fúngicos. As bainhas das plantas da cultivar Labelle, supridas ou não com Si, apresentaram uma maior relação S/G em comparação com as bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409 (Tabela 3). O mesmo

foi observado quando as plantas dessas duas cultivares não foram inoculadas com *R. solani*.

Tabela 3. Relação siringila/guaiacila (S/G) nas bainhas das plantas de arroz das cultivares BR-Irga 409 e Labelle supridas (+Si) ou não (-Si) com silício obtidas de plantas não inoculadas e inoculadas com *Rhizoctonia solani*.

Tratamentos	Labelle		BR-Irga 409	
	+Si	-Si	+Si	-Si
Plantas não inoculadas	0,187	0,197	0,175	0,186
Plantas inoculadas	0,213	0,202	0,166	0,191

Nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409 inoculadas com *R. solani*, as áreas dos derivados da lignina do tipo *p*-hidroxifenila foram superiores, em aproximadamente, 57% em relação a cultivar Labelle. As bainhas das plantas da cultivar BR-Irga-409 quando inoculadas aumentaram em 10% as áreas dos derivados da lignina do tipo *p*-hidroxifenila em relação às plantas não inoculadas. A hipótese para a resistência da cultivar Labelle em relação a cultivar BR-Irga-409 possa estar relacionado com outros compostos de defesa produzidos pelas plantas que não foram identificados por essa metodologia. Kuroda *et al.* (1995) observaram que amostras de bainhas e folhas de arroz analisadas por Pi-CG-EM apresentam abundantes derivados de lignina do tipo *p*-hidroxifenila. Para as duas cultivares, supridas com Si, não houve aumento na soma das áreas dos derivados totais da lignina. A hipótese para essa observação deve-se ao fato de que o gasto energético para absorção do Si não dever ter potencializado a formação dos derivados da lignina. Porém, quando as plantas são infectadas por *R. solani*, na ausência de Si, houve aumento na área dos derivados da lignina, indicando uma reação da planta a infecção pelo patógeno.

Segundo Dallagnol (2008), a concentração de derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) em plantas de arroz infectadas por *Bipolaris oryzae* não supridas com Si foi menor do que a concentração obtidas para as plantas supridas com esse elemento. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues *et al.* (2005) para o patossistema arroz-*P. grisea*, onde as concentrações de DLATG foram maiores nas folhas das plantas não supridas com Si do que nas plantas supridas com esse elemento. A aplicação de Si aumentou o conteúdo de lignina em plantas de arroz suscetíveis a *P. grisea*, mas não aumentou em plantas resistentes a brusone quando inoculadas com esse fungo (Cai *et al.*, 2008). Plantas de arroz não inoculadas com o fungo e supridas com Si

não diferenciaram na quantidade de lignina em relação a plantas não supridas com esse elemento (Cai *et al.*, 2008).

Para a área dos derivados de carboidratos (Tabela 1), observou-se que nas bainhas das plantas supridas ou não com Si, houve um aumento de aproximadamente 9,5% após a infecção por *R. solani*. A análise das áreas dos derivados de carboidratos e de lignina total nas bainhas das plantas das duas cultivares, supridas ou não com Si, mostrou que aproximadamente 66% da área foi de derivados de carboidratos, mesmo considerando que essas amostras não estiveram livres de extrativos em sua constituição. Azuma & Koshimjima (1988) analisaram colmos de arroz livres de extrativos e encontraram 64% de carboidratos em relação à lignina. O ácido *p*-coumárico somente foi encontrado nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga 409. Observou-se um aumento da área do ácido *p*-coumárico nas amostras de bainhas infectadas por *R. solani* (Tabela 1). Embora o papel do ácido *p*-coumárico na parede celular da planta não seja bem compreendido (Lewis & Yamamoto, 1990), existem evidências de que esse composto dificulta a digestibilidade de certos tecidos por ruminantes (Burritt *et al.*, 1984).

O presente trabalho apresenta evidências de que o aumento da resistência do arroz à queima das bainhas, especialmente na cultivar Labelle, potencializada pelo Si, pode estar associado com um aumento na relação siringila/guaiacila nos tecidos da bainha.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Azuma J, Koshimjima T. (1988) Lignin-carbohydrate complexes from various sources. *Methods Enzymology* 161:12-18.
- Bélangier RR, Benhamou N, Menzies JG. (2003) Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology* 93:402-412.
- Buranov AU, Mazza G. (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28:237-259.
- Burritt EA, Bittner AS, Street JC, Anderson MJ. (1984) Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall with *in vitro* dry matter digestibility of three maturing. *Grasses Journal Dairy Science* 67:1209-1210.
- Boon JJ. (1989) An introduction to pyrolysis mass spectrometry of lignocellulosic materials: Case studies on barley straw, corn stem and agropyron. In: *Physico-Chemical*

- Characterization of Plant Residues for Industrial and Feed Use: Chesson A, Orskov ER, (Eds.). Elsevier Applied Science: London, p. 25-49.
- Cai K, Gao D, Luo S, Zeng R, Yang J, Zhu X. (2008) Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. *Physiologia Plantarum* 134:324-333.
- Datnoff LE, Rodrigues FÁ, Seebold KW. (2007) Silicon and plant diseases. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (Eds.). *Mineral Nutrition and Plant Diseases*, St. Paul, MN, USA APS Press, p. 233-246.
- Dallagnol, LJ. (2008) Absorção ativa do silício e a mancha parda do arroz: componentes de resistência e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação planta-patógeno. Viçosa, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, dissertação de mestrado.
- Deng L, Wang Y, Zhang Y, Ma R. (2007) The enhancement of ammonia pre-treatment on the fermentation of rice straw hydrolysate to xylitol. *Journal Food Biochemical* 31:195-205.
- Epstein E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academic Science* 91:11-17.
- Fengel DE, Wegner G. (1983) *Wood chemistry, ultrastructure and reactions*. Berlin-New York: Walter de Gruyter & Co. 613p.
- Greenland DJ. (1997) *The sustainability of rice farming*. CAB International, Wallingford, UK and IRRI, Los Baños, Philippines. 273p.
- Groth DE, Rush MC, Lindberg GD. (1990) Foliar fungicides for control of rice diseases in the United States. In: Grayson BT, Green MB, Copping LG. (Eds.). *Pest Management in Rice*, Elsevier, London, p.31-52.
- Harris PJ, Hartley RD. (1980). Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* 8:153-160.
- Hashiba T, Kobayashi T. (1996) Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: Sneh B, Jabahi-Hare S, Neate S, Dijst G. (Eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 331p.
- Hatfield R, Vermerris W. (2001) Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. *Plant Physiology* 126:1351-1357.
- Higuchi T. (1990) *Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation*. Wood Science. Technology 24:23-63.
- Hoagland DR, Arnon DI. (1950) The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.

- Hon DNS, Shiraishi N. (2001) Wood and cellulosic chemistry. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker. 914p.
- Inanaga S, Okasaka A, Tanaka S. (1995) Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? Japan Journal Soil Science Plant Nutrition 11:111-117.
- Jin S, Chen H. (2006) Structural properties and enzymatic hydrolysis of rice straw. Process Biochemical 41:1261-1264.
- Jones DH. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry 23:1349-1360.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia MG, Brasil. Boletim Técnico, Universidade Federal de Uberlândia. 24p.
- Kuroda Ken-Ichi, Suzuki A, Kato M, Imai K. (1995) Analysis of rice (*Oryza sativa* L.) lignin chromatography by pyrolysis-gas. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 34:1-2.
- Lapierre C. (1993) Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J. (Eds.). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy, Madison, p.133-166.
- Lewis NG, Yamamoto E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41:455-496.
- Li Z, Pinson SRM, Marchetti MA, Stansel JW, Park WD. (1995) Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). Theoretical and Applied Genetics 91:382-388.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. Plant Physiology 130:2111-2117.
- Meier D, Faix O. (1992) Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. In: Lin SY, Dence CW. (Eds.). Methods in Lignin Chemistry, Springer, Berlin. 177p.
- Menzies JG, Ehret DL, Glass ADM, Samuels AL. (1991) The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. Physiological Molecular Plant Pathology 39:403-414.
- Ralph J, Hatfield RD. (1991) Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. Journal of Agriculture Food Chemistry 39:1426-1437.
- Ride JP. (1975) Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. Physiology Plant Pathology 5:125-134.
- Rodrigues FÁ, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Bélanger RR. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance.

Phytopathology 93:535-546.

Rodrigues FÁ, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC. (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Diseases* 85:827-832.

Rodrigues FÁ, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94:177-183.

Rodrigues FÁ, 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* 66:144-59.

Rush MC, Lee FN. (1992) Sheath blight. In: Webster RK, Gunnell PS. (Eds.). *Compendium of Rice Diseases*, American Phytopathological Society, St. Paul, MN. p.22-23.

Scalbert A, Monties B, Rolando C, Sierra-Escudero A. (1986) Formation of ether linkage between phenolic acids and gramineae lignin: a possible mechanism involving quinone-methide. *Holzforschung* 40:191-195.

Shaner G, Finney RE. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.

Sarkanen KV, Ludwig C. (1971) *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience: New York. p.74-79.

Sun RC, Sun XF, Wang SQ, Zhu W, Wang XY. (2002) Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops Products* 15:179-188.

Summers MD, Jenkins BM, Hyde PR, Williams JF, Mutters RG, Scardacci SC. (2003) Biomass production and allocation in rice with implications for straw harvesting and utilization. *Biomass Bioenergy* 24:163-73.

Tsutsumi Y, Kondo R, Sakai K, Imamura H. (1995) The difference of reactivity between syringyl lignin and guaiacyl lignin in alkaline systems. *Holzforschung* 49:423-428.

Winslow MD. (1992) Silicon, disease resistance, and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. *Crop Science* 32:1208-1213.

Capítulo 5

Concentração de açúcares totais e de lignina nas bainhas de plantas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*

RESUMO

Concentração de açúcares totais e de lignina nas bainhas de plantas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*

A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma das mais importantes e destrutivas doenças que afetam a produção de arroz no mundo. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do silício (Si) na concentração de açúcares totais e de lignina insolúvel e solúvel em bainhas de plantas de arroz infectadas pelo fungo *R. solani*. Plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 e Labelle foram crescidas em vaso contendo solução nutritiva com (+Si) ou sem (-Si). Plantas supridas com Si a concentração de Si nas bainhas das plantas das cultivares Labelle e BR-Irga-409 foram de 77 e 84%, respectivamente, em comparação com tratamento (-Si). Não houve efeito significativo do fator cultivares e da interação entre os fatores cultivares de arroz e plantas supridas ou não com Si ($P \geq 0,05$). O comprimento relativo da lesão da queima das bainhas foi significativamente menor ($P < 0,05$) nas bainhas das plantas supridas com Si em relação às bainhas das plantas não supridas com esse elemento. A concentração de açúcares totais e dos cinco tipos de açúcares na bainha das plantas das duas cultivares, inoculadas ou não com *R. solani*, foi bem semelhante entre os tratamentos -Si e +Si. Entretanto, para as duas cultivares na presença de Si, a concentração de açúcares totais mostrou-se inferior, comparado com as duas cultivares na ausência de Si. Para a concentração de lignina insolúvel, solúvel e total, observou-se que não houve variação entre as duas cultivares. As comparações entre os tratamentos -Si e +Si quando inoculadas ou não com *R. solani*, observou-se uma tendência de aumento na concentração da lignina insolúvel e total na presença de Si. Os resultados sugerem que plantas de arroz, supridas com Si, aumenta à resistência das bainhas do arroz a queima das bainhas, possivelmente aumentando a lignificação dos tecidos e a diminuição de açúcares totais.

Palavras chaves: Controle de doenças, nutrição mineral, *Oryza sativa* L. e queima das bainhas.

ABSTRACT

Concentration of total sugars and lignin on rice sheath infected by *Rhizoctonia solani*

Sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, is one of the most important and destructive disease affecting rice production worldwide. This study aimed to determine the effect of silicon (Si) on sugars concentration and insoluble and soluble lignin on rice sheaths of plants infected by *R. solani*. Rice plants of cultivars BR Irga-409 and Labelle were grown in pots containing nutrient solution with (+Si) or without (-Si) Si. Plants supplied with Si concentration of Si in the sheaths of the plant cultivars Labelle and BR Irga-409 were 77 and 84% respectively, compared with treatment (-Si). No significant factor cultivars and the interaction between the factors cultivar and plants supplied with or without Si ($P \geq 0.05$). Relative lesion length was significantly lower on sheaths of plants supplied with Si compared to sheaths from plants not supplied with this element. The concentration of total sugars and the five types of sugars in the sheath of the plants of both cultivars, inoculated or not with *R. solani*, was very similar between treatments -Si and +Si. However, for both cultivars when Si, the total sugar content was lower, compared with two cultivars in the absence of Si to the concentration of insoluble lignin, soluble and total, there was no variation between both cultivars. Comparisons between treatments +Si and -Si inoculated or not with *R. solani*, there was a tendency of increasing the concentration of total and insoluble lignin in the presence of Si results suggest that rice plants supplied with Si increases the strength of the blight sheaths rice sheaths, possibly increasing lignification of tissues and reducing sugars.

Keywords: Control of diseases, nutrition, *Oryza sativa* L. and sheaths blight.

1. INTRODUÇÃO

A queima das bainhas, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma doença importante na Ásia, Estados Unidos da América, Índia, Nigéria, Taiwan, Suriname, Venezuela, Madagascar e também no Brasil (Gangopadhyay & Chakrabarti, 1982). No Brasil, as condições climáticas favoráveis ao progresso da doença e a utilização de cultivares suscetíveis ao patógeno são fatores primordiais para a redução na produção de grãos (Anne Sitarama Prabhu, Comunicação Pessoal).

Os nutrientes minerais exercem funções específicas no metabolismo vegetal, afetando o crescimento e a produção, bem como alterando a morfologia e a anatomia celular, como a composição química, aumentando ou reduzindo a resistência das plantas aos patógenos (Marschner, 1988). A resistência das plantas às doenças, apesar de ser geneticamente controlada, pode ser influenciada pelos fatores ambientais. A nutrição mineral é um fator ambiental de fácil manipulação para o controle de doenças de plantas, entretanto, é necessário conhecer como os nutrientes minerais aumentam ou diminuem a resistência das plantas aos patógenos ao afetarem o processo de patogênese. O silício (Si), embora seja um dos elementos minerais mais abundantes na natureza, não é considerado essencial às plantas. Mesmo assim, esse elemento tem controlado importantes doenças fúngicas em arroz como a brusone, a mancha parda, a escaldadura, a mancha estreita, a podridão do colmo e a mancha dos grãos (Datnoff *et al.*, 2007).

Os açúcares desempenham um papel importante na resistência das plantas aos patógenos. Os açúcares fazem parte da biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos (Smeeckens, 2000). O conteúdo de açúcares nos tecidos de uma determinada espécie de planta pode torná-la mais ou menos suscetíveis a ocorrência de doenças (Vidhyasekaran, 1988). Na condição de baixo teor de açúcar, ocorre o favorecimento de doenças causadas por patógenos necrotróficos. Para os patógenos biotróficos, faz-se necessário que ocorra um maior teor de açúcar nos tecidos da planta atacada (Vanderplank, 1984). No caso da podridão das raízes, causadas por *R. solani*, o maior teor de açúcares no hipocótilo e nas raízes das plântulas permite uma maior severidade da doença (Vidhyasekaran, 1988). Entretanto, a concentração de açúcares totais está relacionado com a temperatura do ambiente, pois para temperaturas menores de 15°C a concentração de açúcares aumenta, em temperaturas superiores a 20°C ocorre uma

diminuição na concentração de açúcares e uma conseqüente redução na agressividades de certos patógenos(Vidhyasekaran, 1988).

Sabe-se que sob condição de alto teor de açúcares nos tecidos de plantas normalmente suscetíveis à patógenos, ocorre uma inibição na produção de toxinas e de enzimas líticas (Vidhyasekaran, 1988). A composição química da bainha de uma planta de arroz é heterogênea e complexa e difere em relação a parte da planta analisada (Jin & Chen, 2006) e da cultivar (Summers *et al*, 2003). Na espécies de plantas cultivadas, o teor de lignina pode variar de 10 a 30%, a qual encontra-se presente na parede celular e na lamela média (Hon & Shiraishi, 2001). A lignina é importante para planta, pois participa do fortalecimento da parede celular contra o ataque por patógenos e insetos (Hatfield & Vermerris, 2001).

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do Si na concentração de açúcares totais e de lignina insolúvel e solúvel em bainhas de plantas de arroz infectadas pelo fungo *R. solani*.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Crescimento das plantas

Sementes de arroz das cultivares BR-Irga 409 e Labelle, suscetíveis à *R. solani*, foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 10% (vol/vol) por 2 min, lavadas em água destilada por 3 min, e colocadas para germinar em papel germiteste umedecido. Os rolos de papel germiteste foram colocados em câmara de germinação a 25°C por 6 dias. As plântulas foram crescidas em vasos plásticos com solução nutritiva meia força por sete dias. Após esse período, as plantas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 litros de solução nutritiva modificada de Hoagland & Arnon (1950) até aos 60 dias após o transplântio (estádio de máximo perfilhamento). Essa solução nutritiva foi constituída de: 1,0 mM KNO₃; 0,25 mM NH₄H₂PO₄; 0,1 mM NH₄Cl; 0,5 mM MgSO₄7H₂O; 1,0 mM Ca(NO₃)₄H₂O; 0,30 µM CuSO₄5H₂O; 0,33 µM ZnSO₄7H₂O; 11,5 µM H₃BO₃; 3,5 µM MnCl₂4H₂O; 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄H₂O; 25 µM FeSO₄7H₂O; e 25 µM EDTA bisódico. A solução nutritiva, sem aeração, foi trocada a cada quatro dias. O pH da solução foi monitorado diariamente e mantido em 5,5 utilizando-se soluções 1 M de NaOH ou HCl, quando necessário.

2.2. Inoculação e avaliações

Nesse estudo, foi utilizado o isolado de *R. solani* CNPAF Rs-1 (AG-1 IA) fornecido pelo Dr. Anne Sitarama Prabhu (CNPAF). Micélio e escleródios do fungo foram preservados em papel de filtro. Para a produção de inoculo, após o crescimento do fungo em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), discos do meio contendo micélio foram retirados e distribuídos em novas placas de Petri contendo BDA. Na superfície do meio de cultura contido em cada placa de Petri, foram colocados pedaços de palito de dente, de aproximadamente 1 cm de comprimento, que serviram como suporte para o crescimento do fungo. Os pedaços de palito de dente, foram previamente lavados em água quente para remover possíveis substâncias tóxicas, foram colocados em frascos contendo BDA e autoclavados por 20 min (Rodrigues et al., 2001). As placas contendo micélio fúngico crescendo sobre e também no interior dos palitos, foram transferidas para câmara de crescimento (25°C, fotoperíodo de 12 h luz/escuro) onde permaneceram por 5 dias. A segunda bainha do perfilho principal de cada uma das plantas de cada cultivar de arroz foi inoculada colocando, com auxílio de uma pinça estéril, um pedaço de palito colonizado pelo fungo. As bainhas inoculadas foram amarradas aos perfilhos das plantas com fitilhos. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$. Avaliou-se o comprimento da lesão da queima das bainhas em cada bainha inoculada às 96 horas após a inoculação (hai) das plantas com o auxílio de um paquímetro digital. O comprimento relativo da lesão (CRL) foi calculado dividindo o comprimento da lesão (em cm) pelo comprimento da bainha (em cm) x 100.

2.3. Determinação da concentração de Si

Após o término do experimento, as bainhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas, secadas em estufa a 65°C até atingirem peso constante e moídas em moinho tipo Wiley para determinação da concentração de Si (Korndörfer *et al.*, 2004).

2.4. Determinação da lignina insolúvel, solúvel e total

As concentrações da lignina insolúvel e da lignina solúvel nas bainhas das plantas das repetições de cada tratamento coletadas de plantas inoculadas (96 hai) ou não inoculadas (0 h) com *R. solani* foram determinadas de acordo com as metodologias descritas, respectivamente, por Gomide & Demuner (1986) e Goldschmid (1971). A concentração da lignina total foi o somatório da concentração desses dois tipos de lignina. Foram obtidas duas amostras de bainhas de cada tratamento, cada qual composta por 10 bainhas. As bainhas coletadas foram armazenadas em geladeira por 24 horas e depois trituradas em um micro moinho analítico, separou os fragmentos em peneiras de 40 e 60 mesh. Para a remoção de pigmentos, os fragmentos de bainha (2 g de material absolutamente seco) foi submetido ao aparelho Soxhlet com 150 mL de acetona durante 16 ciclos de lavagens por 4 horas. Após a remoção do extrativo, os fragmentos foram colocados em estufa a 70°C por 12 horas para volatilização da acetona. Um total de 300 mg de fragmentos foram transferidos para tubos de ensaio e, em seguida, adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico a 72%. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho maria por 1 hora sob contínua agitação com bastão de vidro. A suspensão foi retirada do tubo de ensaio e colocada em um frasco de vidro hermeticamente fechado, no qual adicionou-se, previamente, 84 mL de água destilada. Esses frascos foram colocados em autoclave a 120°C por 1 hora. O extrato foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado, o qual continha uma fina camada (2 a 3 mm) de óxido de alumínio previamente pesado. O filtrado foi guardado para determinação da concentração de lignina solúvel. A lignina contida no cadinho foi lavada com água destilada quente até a completa remoção do ácido. O cadinho foi seco em estufa a 105°C até atingir peso constante com a aferição da massa. A concentração da lignina Klason insolúvel (LKI) foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{LKI} = (\text{peso do resíduo em gramas} / \text{peso inicial da amostra em gramas}) \times 100.$$

O filtrado da lignina de Klason foi transferido para balão volumétrico de 1 l, cujo volume foi completado com água destilada. Em seguida, determinou-se a absorção das amostras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. As determinações das concentrações da lignina insolúvel e solúvel foram feitas em triplicatas para cada um dos tratamentos. A concentração de lignina solúvel (CLS) foi determinada de acordo com seguinte fórmula:

$$CLS = ((4,538 \times Abs_{215}) - Abs_{280}/300 \times P) \times 100$$

2.5. Determinação da Concentração de Açúcares Totais

Para a determinação da concentração de açúcares totais, o volume da amostra injetada no cromatógrafo iônico (DX 600 - Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) correspondeu a 20 µl, utilizando amostrador automático. Como fase estacionária, utilizou-se a coluna analítica CarboPac PA-1 (250 x 4 mm, Dionex). A temperatura de análise foi de 28 °C. Os monômeros de carboidratos foram eluídos com fase móvel composta de água ultra-pura e NaOH 3 mol/L (99/1% v/v). O fluxo de eluição foi de 1,0 ml/min. A identificação dos compostos foi feita comparando o tempo de retenção de cada composto com o de amostras padrões. Os padrões utilizados foram glicose, manose, xilose e galactose. O padrão interno foi a fucose. Todo o sistema cromatográfico foi controlado por meio do software Chromeleon (Dionex).

2.6. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 com três repetições. Os fatores estudados foram: duas cultivares de arroz e plantas supridas (+Si) ou não (-Si) com Si. Cada repetição foi constituída por um vaso plástico contendo duas plantas de arroz. Os dados do CRL da queima das bainhas e da concentração de Si na bainha foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste-*t* (quando não houve interação entre os fatores) ou pelo teste de Tukey (interação significativa) ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.0 (Institute Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo para os fatores cultivares de arroz e plantas supridas ou não com Si, bem como para a interação desses fatores ($P \leq 0,05$) para a concentração de Si nas bainhas. Na presença de Si, houve um aumento de 77 e 84%, respectivamente, na concentração de Si nas bainhas das plantas das cultivares Labelle e BR-Irga-409 em relação ao tratamento -Si (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração (%) de silício (Si) nas bainhas das plantas de arroz das cultivares Labelle e BR-Irga supridas (+Si) ou não (-Si) com Si.

Cultivares	-Si	+Si
Labelle	0,98 aA	4,32 aB
BR-Irga-409	0,52 bA	3,39 bB

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A concentração de Si nas bainhas das plantas da cultivar Labelle foi significativamente maior do que nas bainhas das plantas da cultivar BR-Irga-409, independente da presença ou ausência de Si na solução nutritiva. Rodrigues et al. (2001) observaram que plantas de arroz supridas com Si apresentaram um aumento de 80% na concentração de Si na bainha. Dallagnol et al. (2009) encontrou um aumento de até 320% de Si nas folhas de plantas crescidas em solução nutritiva contendo Si em relação às plantas não supridas com esse elemento. Plantas como o arroz e a cana de açúcar chegam a acumular até 5% de Si na matéria seca (Epstein, 1994).

Não houve efeito significativo do fator cultivares e da interação entre os fatores cultivares de arroz e plantas supridas ou não com Si ($P \geq 0,05$) para o CRL da queima das bainhas. Apenas o fator plantas supridas ou não com Si foi significativo para essa variável. O CRL foi significativamente menor ($P < 0,05$) nas bainhas das plantas supridas com Si em relação às bainhas das plantas não supridas com esse elemento (Fig. 1). Rodrigues et al. (2001, 2003) mostraram que plantas de arroz supridas com Si apresentaram uma redução na severidade da queima das bainhas e na área abaixo da curva do progresso da extensão da lesão.

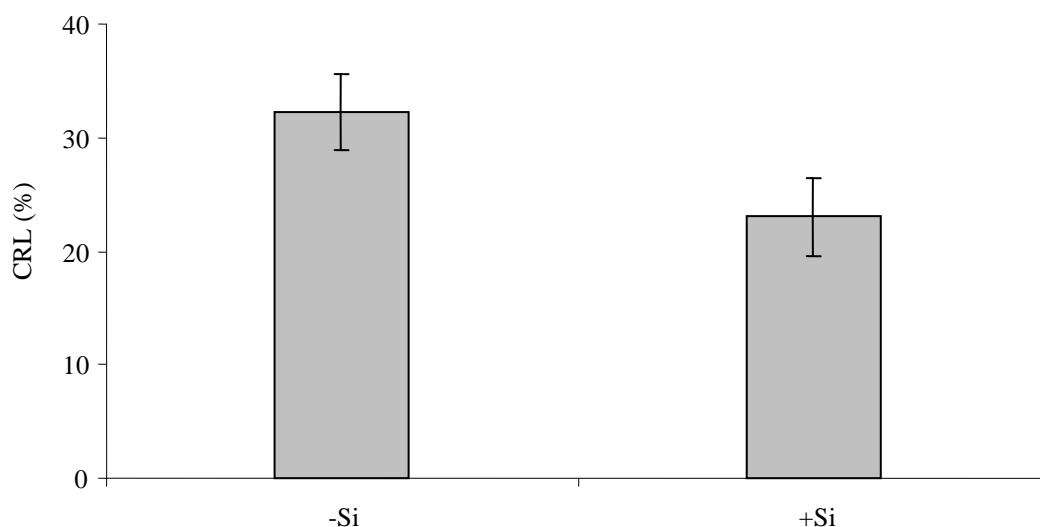


Figura 1. Comprimento relativo da lesão (CRL) da queima das bainhas nas bainhas das plantas de arroz supridas (+Si) ou não (-Si) com silício (Si). O desvio padrão está representado em cada barra.

A concentração de açúcares totais e dos cinco tipos de açúcares na bainha das plantas das duas cultivares, inoculadas ou não com *R. solani*, foi bem semelhante entre os tratamentos -Si e +Si (Fig. 2). Entretanto, para as duas cultivares na presença de Si, a concentração de açúcares totais mostrou-se inferior comparado com as plantas das duas cultivares na ausência de Si (Fig. 2). A concentração de açúcares totais foi de aproximadamente 50% nas bainhas das plantas de arroz, já Azuma & Koshimjima (1988) analisando bainhas de arroz, livres de extrativos e despectinadas, encontraram 64% de carboidratos sendo 80% de xilose, 13% de arabinose, 4,3% de glicose, 2,3% de galactose e 0,4% de manose. Prabhu *et al.* (2007) verificaram que as folhas com a maior severidade de brusone foram as que apresentaram a maior concentração de açúcares. Além disso, esses autores verificaram que o aumento nas doses de Si no solo resultou em uma menor concentração de açúcares nas folhas de arroz. Chang *et al.* (2002) observaram que plantas de arroz com maior severidade da queima bacteriana, causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, apresentavam maior quantidade de açúcares. Com o aumento na dose de Si, houve uma redução no conteúdo de açúcares e, conseqüentemente, na severidade da doença. Alterações na concentração de carboidratos ocorrem quando as plantas são cultivadas em diferentes condições nutricionais. Plantas com maior concentração de açúcares nos seus tecidos tornam-se mais suscetíveis a brusone (Notteghem, 1981).

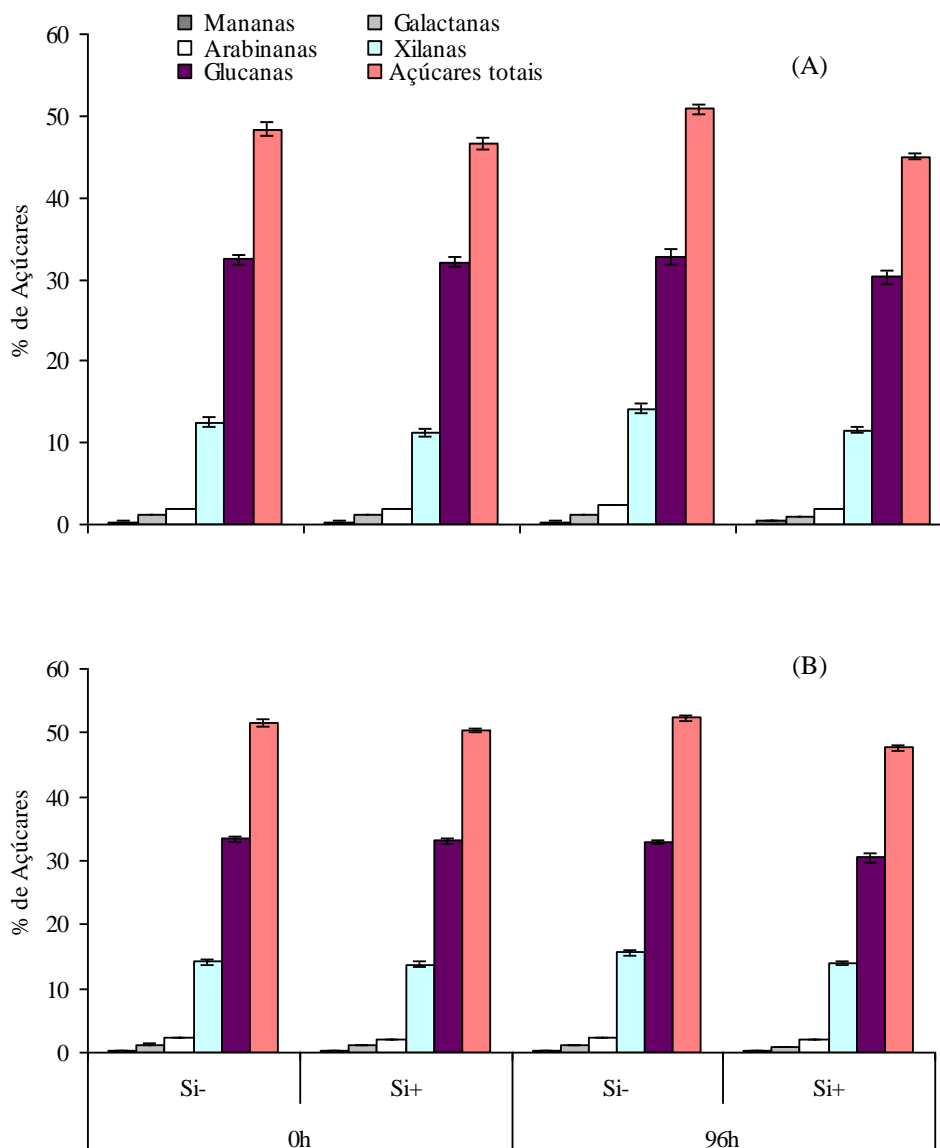


Figura 2. Concentração de açúcares totais e dos carboidratos mananas, arabinanas, glucanas, galactanas e xilanas nas bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (A) e Labelle (B) supridas (+Si) ou não (-Si) com silício (Si) e inoculadas (coleta às 96 h após inoculação) ou não (0 h) com *Rhizoctonia solani*. O desvio padrão está representado em cada barra.

Para a concentração de lignina insolúvel, solúvel e total (Fig. 3), observou-se que não houve variação entre as duas cultivares para os tratamentos -Si e +Si, independente se as plantas foram inoculadas ou não com *R. solani*.

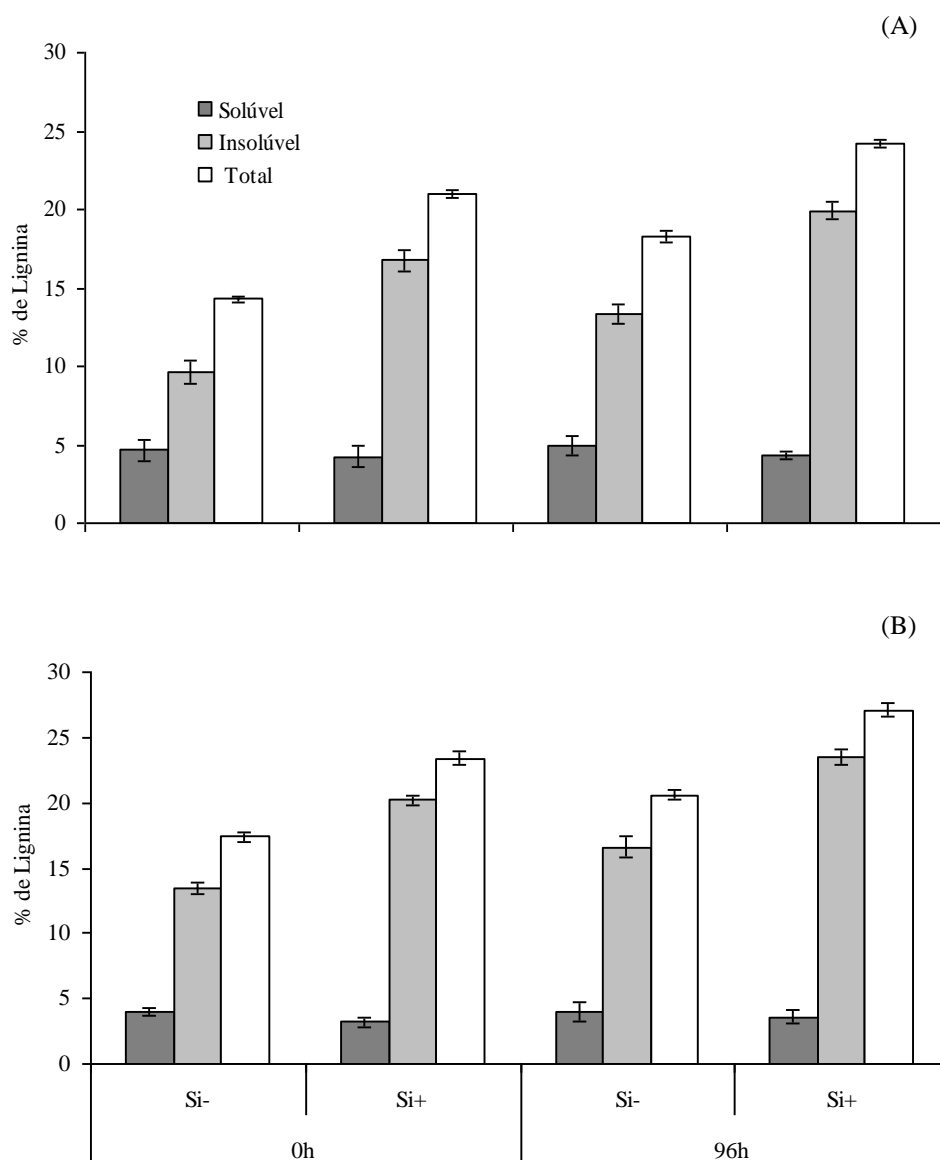


Figura 3. Concentração de lignina solúvel, lignina insolúvel e lignina total nas bainhas de plantas de arroz das cultivares BR-Irga-409 (A) e Labelle (B) supridas (+Si) ou não (-Si) com silício (Si) e inoculadas (coleta às 96 h após inoculação) ou não (0 h) com *Rhizoctonia solani*. O desvio padrão está representado em cada barra.

Entretanto, comparações entre os tratamentos -Si e +Si para qualquer uma das cultivares quando inoculadas ou não com *R. solani*, observou-se uma tendência de aumento na concentração da lignina insolúvel e total na presença de Si. Plantas de trigo supridas com Si apresentaram um aumento na concentração de lignina em resposta a infecção por *Bipolaris sorokiniana* (Domiciano *et al.*, 2010). De acordo com Azuma & Koshimjima (1988), a concentração de lignina insolúvel e solúvel nas bainhas de arroz é da ordem de 27 e 5,6%, respectivamente. Plantas de trigo supridas com Si e inoculadas com *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* apresentaram uma menor concentração de

lignina em comparação com plantas não supridas com Si e infectadas pela bactéria (Silva *et al.*, 2010). Cai *et al.* (2008) observaram que a concentração de lignina nas folhas das plantas de arroz supridas com Si não foi maior do que o observado nas folhas das plantas não supridas com esse elemento. Quando as plantas de arroz foram supridas com Si e inoculadas com *Pyricularia grisea*, a concentração de lignina aumentou em 36% em relação às plantas inoculadas crescidas na ausência de Si. Rodrigues *et al.* (2005) também encontraram aumento na concentração de lignina em folhas de plantas de arroz supridas com Si e inoculadas com *P. grisea*. Acredita-se que o Si esteja associado com um complexo lignina-carboidrato na parede celular das células da epiderme o que pode de certa forma contribuir para uma maior lignificação da parede celular de arroz (Inanaga *et al.*, 1995).

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a redução da colonização dos tecidos da folha de arroz pelo fungo *R. solani* observado nas bainhas das plantas supridas com Si, deve-se possivelmente ao aumento da lignificação dos tecidos e a diminuição de açúcares totais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azuma J, Koshimjima T. (1988) Lignin-carbohydrate complexes from various sources. *Methods in Enzymology* 161:12-18.
- Chang SJ, Tzeng DDS, Li CC. (2002) Effect of silicon nutrient on bacterial blight resistance of rice (*Oryza sativa* L). In: Second Silicon in Agriculture Conference, Tsuruoka, Japan, p.31-33.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FÁ, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* 99:116-121.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW (2007) Silicon and Plant Nutrition. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds.) Mineral nutrition and plant disease. Saint Paul MN. APS Press, pp. 233-246.
- Domiciano GP, Rodrigues FÁ, Vale FXR, Xavier-Filha MS, Moreira WR, Andrade CCL, Pereira SC (2010) Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. *Journal Phytopathology* 158:334-343.
- Epstein E. (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academic Science* 91:11-17.

- Gangopadhyay S, Chakrabarti NK. (1982) Sheath blight of rice. *Review of Plant Pathology* 61:451-460.
- Goldschmid O. (1971) Ultraviolet spectra. In: Sarkanen KV, Ludwig CH (Eds.). *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. John Wiley & Sons. New York, pp 241–266.
- Gomide JL, Demuner BJ. (1986) Determinação do teor de lignina na madeira: método Klason modificado. *O Papel* 47:36-38.
- Inanaga S, Okasaka A, Tanaka S. (1995) Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 11:111-117.
- Jin S, Chen H. (2006) Structural properties and enzymatic hydrolysis of rice straw. *Process Biochemical* 41:1261-1264.
- Hatfield R, Vermerris W. (2001) Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. *Plant Physiology* 126:1351-1357.
- Hon DNS, Shiraishi N. (2001) *Wood and cellulosic chemistry*. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, 914 p.
- Hoagland DR, Arnon DI. (1950) The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.
- Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. p.24.
- Marschner H. (1988) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2^a ed., San Diego: Academic Press. p.436-460.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu GF. (2002) A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology* 130:2111-2117.
- Notteghem JL. (1981) Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: *International Rice Research Institute (Los Baños, Filipinas). Blast and upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement*. Los Baños. p.43-51.
- Prabhu AS, Santos AB, Didonet AD. (2007) Soluble tissue sugar content and leaf blast severity in response to the application of calcinated serpentinite as a silicon source in irrigated rice. *Summa Phytopathologica* 33:402-404.
- Rodrigues FÁ, Datnoff LE, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC. (2001) Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease* 85:827-832.

- Rodrigues FÁ, Vale FXR, Korndörfer GH, Datnoff LE, Oliveira AM, Zambolim L. (2003) Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. *Crop Protection* 22:23-29.
- Rodrigues, FÁ, 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.
- Silva IT, Rodrigues FÁ, Oliveira JR, Pereira SC, Andrade CCL, Silveira PR, Conceição MM. (2010) Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. *Journal Phytopathology* 158:253-262.
- Smeekens S. (2001) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:49-81
- Summers MD, Jenkins BM, Hyde PR, Williams JF, Mutters RG, Scardacci SC. (2003) Biomass production and allocation in rice with implications for straw harvesting and utilization. *Biomass Bioenergy* 24:163-73.
- Vanderplank JE. (1984) Sink-induced loss of resistance. In: Vanderplank, JE (Ed.) *Diseases Resistance in Plants*, 2^a ed. Academic Press. p.107-116.
- Vidhyasekaran P. (1988) Sugars and Diseases Resistance. In: Vidhyasekaran, P (Ed.). *Physiology of Diseases Resistance in Plants*. CRC Press. p39-49.
- Winslow MD. (1992) Silicon, disease resistance, and yield of rice genotypes under upland cultural conditions. *Crop Science* 32:1208-1213.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os resultados desse trabalho indicaram que apenas o Derosal, Ethephon e o fosfito de potássio foram eficientes em reduzir o comprimento relativo da lesão da queima das bainhas, possivelmente através da indução de mecanismo(s) de defesa. Os dois produtos a base de silício assim como o acibenzolar-S-metil e a quitosana desacetilada não reduziram o comprimento relativo da lesão da doença.

- A resistência das bainhas de plantas de arroz à queima das bainhas deve-se, em parte, a uma maior resistência física ocasionada pela deposição de Si, a qual colabora para uma menor expansão da lesão.

- Plantas de arroz supridas com silício apresentaram menor CRL da queima das bainhas, crescimento superficial das hifas de *R. solani* nas bainhas, área necrosada pelo patógeno e uma maior intensidade de autofluorescência em cortes transversais.

- O aumento da resistência do arroz à queima das bainhas, especialmente na cultivar Labelle, potencializada pelo Si, pode estar associado com um aumento na relação siringila/guaiacila nos tecidos da bainha.

- A redução da colonização dos tecidos da folha de arroz pelo fungo *R. solani* observado nas bainhas das plantas supridas com Si deve-se, possivelmente, ao aumento da lignificação dos tecidos e a diminuição de açúcares totais.