

SANDRO DAN TATAGIBA

**FOTOSSÍNTESE, METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E
RESPOSTAS DE DEFESA DE PLANTAS DE ARROZ INFECTADAS POR
Microdochium oryzae E SUPRIDAS COM SILÍCIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

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

T

T216f
2013

Tatagiba, Sandro Dan, 1980-

Fotossíntese, metabolismo antioxidativo e respostas de
defesa de plantas de arroz infectadas por *Microdochium oryzae*
e supridas com silício / Sandro Dan Tatagiba. – Viçosa, MG,
2013.

xiii, 126 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Arroz - Resistência a doenças e pragas. 2. Silício.
3. Fotossíntese. 4. Metabolismo. 5. *Microdochium oryzae*.
6. Fisiologia vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.1893

SANDRO DAN TATAGIBA

**FOTOSSÍNTESE, METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E
RESPOSTAS DE DEFESA DE PLANTAS DE ARROZ INFECTADAS POR
Microdochium oryzae E SUPRIDAS COM SILÍCIO**

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

APROVADA: em 05 de julho de 2013

Fábio Murilo da Matta
(Coorientador)

Paulo Cezar Cavatte

Renata Sousa Resende

Wagner Luiz Araújo

Fabício de Ávila Rodrigues
(Orientador)

In memoriam a minha mãe Vera

A meu pai Josmar

pelo incentivo, confiança e exemplo de vida

A minha noiva Anelisa

pelo amor, companherismo e apoio incondicional

DEDICO

A minha irmã Marielle

A todos os familiares

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, de maneira especial ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e ajuda para a realização desse curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Fabrício Ávila Rodrigues pela orientação, apoio, amizade, empenho, dedicação e profissionalismo.

Ao Professor Fábio Murilo da Matta pela orientação e amizade.

A meu padrinho, tio e conselheiro Eduardo Dan pelo apoio e carinho.

Aos integrantes do “Grupo Interação Planta-Patógeno”, Adriano, Alessandro, Alexis, André, Carlos, Fernando, Leandro, Leonardo, Maria, Rayane, Rafael, Renata, Wiler e Wilka, pela ajuda e amizade.

A todos os colegas de curso, pela força, companheirismo e apoio.

BIOGRAFIA

SANDRO DAN TATAGIBA, filho de Vera Lúcia Dan Tatagiba e Josmar Feliciano Tatagiba, nasceu em 08 de agosto de 1980, em Cachoeiro de Itapemirim, Estado do Espírito Santo. Ingressou em 1998, no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ, concluindo-o em julho de 2003. Em fevereiro de 2004, iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Alegre-ES, concluindo-o em fevereiro de 2006. Em agosto de 2009, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, submetendo-se à defesa em 05 de julho de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

Capítulo 1

Limitações fotossintéticas em folhas de arroz infectadas por <i>Microdochim oryzae</i>	4
----------------------------------------------------------------------------------------------	---

RESUMO	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
Crescimento das plantas	8
Inoculação das plantas com <i>M. oryzae</i>	8
Avaliação da expansão das lesões.....	9
Avaliação das trocas gasosas	9
Determinação das concentrações de clorofila e carotenóides.....	9
Avaliação da fluorescência de imagem da clorofila <i>a</i>	10
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	11
RESULTADOS	12
Expansão das lesões	12
Trocas gasosas.....	12
Concentrações de pigmentos	12
Fluorescência de imagem da clorofila <i>a</i>	13
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
TABELAS E FIGURAS	22

Capítulo 2

Alterações no metabolismo antioxidativo e de variáveis fisiológicas em folhas de arroz infectadas por <i>Microdochium oryzae</i>	32
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	37
Crescimento das plantas	37
Inoculação das plantas com <i>M. oryzae</i>	37
Avaliação da expansão das lesões.....	38
Avaliação das trocas gasosas	38
Determinação das concentrações de clorofila e carotenóides.....	38
Avaliação das atividades das enzimas do sistema antioxidativo	39
Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA).....	41

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	42
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	42
RESULTADOS.....	43
Expansão das lesões	43
Trocas gasosas.....	43
Concentração de pigmentos	43
Atividade das enzimas do sistema antioxidativo	43
Concentração de MDA	44
Concentração de H ₂ O ₂	44
DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
FIGURAS	57

Capítulo 3

Trocas gasosas e fluorescência de imagem da clorofila *a* em folhas de plantas de arroz supridas com silício e infectadas por *Microdochium oryzae*

.....	62
RESUMO.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS	66
Crescimento das plantas	66
Inoculação das plantas com <i>M. oryzae</i>	66
Determinação da concentração foliar de Si	67
Avaliação da expansão das lesões.....	67
Avaliação das trocas gasosas	67
Avaliação da fluorescência de imagem da clorofila <i>a</i>	68
Determinação das concentrações de clorofila e carotenóides	69
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	69
RESULTADOS.....	71
Concentração foliar de Si.....	71
Expansão das lesões	71
Trocas gasosas.....	71
Fluorescência de imagem da clorofila <i>a</i>	72
Concentração de pigmentos	74
DISCUSSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
FIGURAS	85

Capítulo 4

Aspectos bioquímicos da resistência do arroz à *Microdochium oryzae* potencializado pelo silício

.....	93
RESUMO.....	94
INTRODUÇÃO.....	95
MATERIAL E MÉTODOS	97

Crescimento das plantas	97
Inoculação das plantas com <i>M. oryzae</i>	97
Determinação da concentração foliar de Si	98
Avaliação da expansão das lesões.....	98
Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA).....	98
Determinação das concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina ácido tioglicólico (DLAT).....	99
Determinação da atividade de enzimas de defesa	101
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	104
RESULTADOS.....	106
Concentração foliar de Si.....	106
Expansão das lesões	106
Concentração de MDA	106
Concentração de CFST.....	106
Concentração de DLATG	106
Atividade de enzimas de defesa	107
DISCUSSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
FIGURAS	121
CONCLUSÕES GERAIS	125

RESUMO

TATAGIBA, Sandro Dan, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Fotossíntese, metabolismo antioxidativo e respostas de defesa de plantas de arroz infectadas por *Microdochium oryzae* e supridas com silício.** Orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues. Coorientador: Fábio Murilo da Matta.

A escaaldadura, causada pelo fungo *Microdochium oryzae*, é uma das principais doenças do arroz (*Oryza sativa*) no Brasil. Considerando que até o momento, informações sobre a interação arroz-*M. oryzae* são escassas, buscou-se, neste trabalho investigar a fotossíntese, o metabolismo antioxidativo e as respostas de defesa de plantas de arroz da cultivar Primavera, supridas ou não com silício (Si) durante o processo infeccioso de *M. oryzae*. No primeiro estudo, uma abordagem a fim de avaliar a diversidade de eventos que ocorrem próximo à área infectada numa mesma folha durante a infecção por *M. oryzae* foi realizada, a fim de contribuir para um maior entendimento na dinâmica fotossintética durante a interação planta-hospedeiro. Para esta finalidade, foi realizada a avaliação de parâmetros e imagens de fluorescência da clorofila *a* em diferentes áreas próximas a lesão, associando-as, às trocas gasosas e a avaliação dos pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz inoculadas ou não inoculadas com *M. oryzae*. Em plantas não inoculadas com *M. oryzae* os valores da fotossíntese (*A*), da condutância estomática (*g_s*) e da taxa transpiratória (*E*) foram maiores em relação às plantas inoculadas, evidenciando o efeito negativo causado pelo fungo nas trocas gasosas, principalmente em *A*. A utilização da energia para os processos fotossintéticos e a capacidade de dissipação do excesso de energia na maquinaria fotossintética demonstrados pelos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a* foi comprometida durante a infecção, reduzindo o rendimento fotoquímico e induzindo a inibição do aparato fotossintético nas áreas lesionadas, evidenciando que a infecção tinha efeito local sobre *A*. Houve

diminuição das áreas verdes na superfície do tecido foliar, ocasionado pela expansão das lesões e aumento de tecido necrótico. As concentrações de pigmentos fotossintéticos diminuíram significativamente com o progresso da escaldadura o que limitou a absorção da radiação fotossinteticamente ativa. No segundo estudo, buscou-se investigar a atividade das enzimas antioxidativas ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR), os danos causados à membrana celular através da concentração de aldeído malônico (MDA), as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de pigmentos fotossintéticos, bem como trocas gasosas em folhas de plantas de arroz durante o processo infeccioso de *M. oryzae*. O progresso da doença promoveu redução da *A*, *gs* e *E*. Houve também incrementos na concentração interna de CO_2 e redução na concentração de pigmentos fotossintéticos ocasionados pela expansão das lesões, comprometendo a absorção da radiação fotossinteticamente ativa e limitando a fotossíntese. As atividades das enzimas envolvidas no sistema antioxidativo nas plantas de arroz infectadas por *M. oryzae* aumentaram na tentativa de impedir o acúmulo de H_2O_2 , principalmente APX, POX e GR, não sendo, entretanto, eficientes na remoção do excesso de H_2O_2 , resultando em dano oxidativo. As concentrações de MDA nas plantas inoculadas mantiveram-se elevadas no final do processo infeccioso, como resultado da peroxidação lipídica. No terceiro estudo, buscou-se, investigar o efeito do Si sobre as trocas gasosas, a eficiência fotoquímica do fotossistema II e a concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*. Para esta finalidade plantas de arroz da cultivar Primavera foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mmol L^{-1} de Si e não inoculadas ou inoculadas com *M. oryzae*. A infecção por *M. oryzae* reduziu o rendimento fotossintético, o qual esteve associado com a menor concentração de

pigmentos fotossintéticos nas folhas. Na presença de Si, a atividade fotossintética e a eficiência de utilização da energia luminosa e sua conversão em energia química foram potencializados, conforme demonstrado pelos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a*, independente da inoculação com *M. oryzae*, confirmando assim, que o Si é um elemento importante no rendimento fotossintético em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*. No quarto estudo, buscou-se, investigar o papel do Si na resistência de plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*. Para esta finalidade, plantas de arroz da cultivar Primavera foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mmol L⁻¹ de Si e inoculadas com *M. oryzae*. A concentração foliar de Si aumentou nas plantas supridas com esse elemento em relação às plantas não supridas o que contribuiu para reduzir a expansão das lesões. A extensão dos danos celulares em resposta a infecção por *M. oryzae* foi reduzida nas plantas supridas com Si, evidenciado pelos menores valores da concentração de MDA. Maiores concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e de derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) nos tecidos foliares das plantas supridas com Si, contribuíram para a resistência à escaudadura. Maiores atividades das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL) e lipoxigenases (LOX), mas não de quitinases (QUI) e β -1,3-glucanases (GLU), nos tecidos foliares das plantas de arroz supridas com Si foram importantes para a resistência à escaudadura. Em conclusão, os resultados do presente estudo evidenciam que o Si pode aumentar a resistência à escaudadura em plantas de arroz, melhorando o rendimento fotossintético e potencializando mecanismos bioquímicos de defesa ao invés de agir apenas como uma barreira física na tentativa de conter a penetração de *M. oryzae*.

ABSTRACT

TATAGIBA, Sandro Dan, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Photosynthesis, metabolism antioxidative and defense responses of rice plants infected *Microdochium oryzae* and supplied with silicon.** Adviser: Fabrício de Ávila Rodrigues. Co-adviser: Fábio Murilo da Matta.

The scald caused by the fungus *Microdochium oryzae* is a major disease of rice (*Oryza sativa*) in Brazil. Whereas until now, information on the interaction rice-*M. oryzae* are scarce, we sought in this paper to investigate photosynthesis, metabolism antioxidative and defense responses of rice plants of cultivar Primavera, or not supplied with silicon (Si) during the infection process of *M. oryzae*. In the first study, an approach to assess the diversity of events that occur near the infected area on one sheet when the infection with *M. oryzae* was carried out in order to contribute to a greater understanding of the dynamics during photosynthetic plant-host. For this purpose, we analyzed the fluorescence parameters and images of chlorophyll *a* in different areas around the injury, associating them, gas exchange and evaluation of photosynthetic pigments in rice plants inoculated or not with *M. oryzae*. Not in plants inoculated with *M. oryzae* values of photosynthesis (*A*), stomatal conductance (*gs*) and transpiration rate (*E*) were higher than those inoculated plants, indicating the negative effect caused by the fungus in gas exchange, especially in *A*. The use of energy for photosynthetic processes and dissipation of excess energy in the photosynthetic machinery demonstrated by fluorescence parameters and images of chlorophyll *a* was compromised during the infection, reducing the yield and photochemical induced inhibition of the photosynthetic apparatus in the injured areas, showing that the infection had local effect on *A*. There was decrease in the surface areas of the green leaf tissue, caused by the expansion of lesions and necrotic tissue augmentation. The photosynthetic pigments decreased significantly with the

progress of scalding which limited the absorption of photosynthetically active radiation. In the second study, we sought to investigate the activity of antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR), damage to the cell membrane through concentration malondialdehyde (MDA), the concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) and photosynthetic pigments as well as gas exchange in leaves of rice plants during the infectious process of *M. oryzae*. The progress of the disease promoted reduction of the *A*, *gs* and *E*. There were also increases in internal CO_2 concentration and reduction in the concentration of photosynthetic pigments caused by the expansion of lesions affecting the absorption of photosynthetically active radiation and limiting photosynthesis. The activities of enzymes involved in the antioxidant system in rice plants infected by *M. oryzae* increased in an attempt to prevent accumulation of H_2O_2 , especially APX, POX and GR is not, however, efficient removal of excess H_2O_2 , resulting in oxidative damage. The concentration of MDA in the inoculated plants remained high at the end of the infection as a result of lipid peroxidation. In the third study, we sought to investigate the effect of Si on gas exchange, photochemical efficiency of photosystem II and the concentration of photosynthetic pigments in rice plants infected by *M. oryzae*. For this purpose the rice plants Primavera were grown in nutrient solution containing 0 or 2 $mmol L^{-1}$ of Si and not inoculated or inoculated with *M. oryzae*. Infection with *M. oryzae* reduced the photosynthetic yield, which was associated with the lowest concentration of photosynthetic pigments in leaves. In the presence of Si, photosynthetic activity and efficiency of utilization of light energy and its conversion into chemical energy were potentiated, as demonstrated by f fluorescence parameters and images of chlorophyll *a*, regardless of inoculation with *M. oryzae*, thus confirming that Si is an important

element in quantum yield in rice plants infected by *M. oryzae*. In the fourth study, we sought to investigate the role of Si in resistance of rice plants infected by *M. oryzae*. For this purpose, the rice plants Primavera were grown in nutrient solution containing 0 or 2 mmol L⁻¹ of Si and inoculated with *M. oryzae*. The Si concentration increased in the leaf of plants supplied with this element in relation to unmet plants which contributes to reduce the spread of lesions. The extent of cellular damage in response to infection with *M. oryzae* was reduced in plants supplied with Si, evidenced by lower values of MDA concentration. Higher concentrations of total soluble phenolics (TSP) and derivatives of lignin-thioglycolic acid (DLATG) in the leaves of plants supplied with Si, contributed to resistance to scald. Major activities of the enzymes peroxidase (POX), polyphenol oxidases (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) but not chitinase (CHI) and β -1, 3-glucanases (GLU) in leaf tissues of rice plants were supplied with Si important for resistance to leaf scald. In conclusion, the results of this study indicate that the Si can increase resistance to scald in rice plants, improving performance and enhancing photosynthetic biochemical defense mechanisms rather than merely acting as a physical barrier in an attempt to contain the penetration of *M. oryzae*.

INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais de maior valor social, devido seu produto ser de importância para a segurança alimentar, geração de renda e estabilidade política dos países produtores (Barata & Perozzi, 2004). Em diversos países, o arroz supre aproximadamente 27% da energia e 20% das proteínas diárias necessárias à população, além de ser fonte de vitaminas (Barata & Perozzi, 2004).

A produção mundial de arroz, nos últimos anos, tem ficado abaixo da taxa de crescimento da população e do consumo, havendo grande preocupação em relação à estabilidade da produção (Embrapa, 2005). Por ser alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, e considerando-se que há uma demanda crescente de alimentos para atender ao aumento da população (Embrapa, 2005), o incremento da produção de arroz, mediante a expansão das áreas de cultivo ou pelo aumento de produtividade, é de particular significância.

No Brasil, o arroz é um dos principais cereais produzidos. Na safra 2001/2002, a cultura ocupou uma área de aproximadamente dois milhões e quatrocentos e vinte e seis mil hectares, atingindo a produção de 11,6 milhões de toneladas, com produtividade média inferior a 4,78 toneladas por hectare (CONAB, 2013). Esta produtividade está muito aquém do potencial genético das cultivares de arroz atuais que é de 10 a 12 toneladas ha^{-1} (IRGA, 2003). Diversos fatores limitam a expressão do potencial de produção de arroz, sendo a ocorrência de doenças um dos principais problemas.

Os danos causados pelas doenças estão relacionados com o manejo técnico da lavoura que determinam as condições nutricionais da planta, com a resistência genética da cultivar, com a condição ambiental predominante na área durante o ciclo da cultura e a medidas de controle adotadas. A medida de controle das doenças

econômica e ecologicamente correta é a utilização de cultivar resistente. No entanto, a disponibilidade de cultivares resistente nem sempre é possível, seja devido à dificuldade de obtenção de resistência contra patógenos como *Microdochium oryzae* (Ou, 1972).

A utilização de medidas de controle cultural como a rotação de culturas e a eliminação de plantas hospedeiras tem efeito negativo sobre os principais patógenos foliares. O controle químico tem apresentado resultados satisfatórios para a maioria das doenças foliares do arroz, porém há problemas ambientais e econômicos decorrentes da aplicação de pesticidas, que se maximizam quando se consideram a extensão das áreas com cultivo irrigado por inundação. A potencialização de defesas bioquímicas da planta mostra-se como alternativa para reduzir os danos causados pelos patógenos sem agressão ao meio ambiente. Uma alternativa é a utilização do silício (Si) para o controle de doenças do arroz. Para a escaldadura, até o momento, não há relatos na literatura dos mecanismos bioquímicos que podem ser potencializados por esse elemento, a fim de reduzir a doença, carecendo de pesquisas para desvendar os mecanismos pelo qual o Si aumenta à resistência da planta. Diversos trabalhos têm demonstrado que o controle de doenças em arroz pelo Si esta intimamente relacionada com um maior acúmulo desse elemento (Datnoff *et al.*, 1992; Seebold *et al.*, 2001). Neste contexto, este trabalho procurou avaliar a fotossíntese, o metabolismo antioxidativo e as respostas de defesa de plantas de arroz da cultivar Primavera, supridas ou não com silício (Si) durante o processo infeccioso de *M. oryzae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barata TS, Perozzi MA, 2004. *Importância econômica do arroz no contexto mundial*.

Traduzido de <http://www.fao.org/rice2004/> (acessado em: 06 de Agosto de 2013).

CONAB, 2013. *Séries Históricas Relativas às Safras 1976/77 a 2012/2013 de Área Plantada, Produtividade e Produção*. Traduzido de <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=/> (acessado em: 06 de Agosto de 2013).

Datnoff LE, Snyder GH, Deren CW, 1992. Influence of silicon fertilizer grades on blast and brown spot development and on rice yields. *Plant Disease* 76, 1011-3.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil: *Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz*. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção 3: Versão Eletrônica - online. Nov., 2005. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm> (acessado em: 06 de Agosto de 2013).

IRGA, 2003. Projeto 10-RS: *Manual de procedimentos*. Porto Alegre: Irga.

Ou SH, 1972. *Rice Diseases*. UK: Commonwealth Agricultural. Bureau, Slough.

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, 63-9.

Capítulo 1

Limitações fotossintéticas em folhas de arroz infectadas por

Microdochium oryzae

RESUMO

A maioria dos estudos envolvendo a fotossíntese em respostas ao ataque de patógenos tem se restringido a análise de folhas inteiras ou grandes extensões com os sintomas da doença. Uma abordagem a fim de avaliar a diversidade de eventos que ocorrem próximo à área infectada numa mesma folha por um patógeno seria conveniente, contribuindo para um maior entendimento na dinâmica fotossintética na interação planta-hospedeiro. Dessa forma, procurou-se neste estudo investigar imagens e parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em diferentes áreas próximas a lesão, associando-as, às trocas gasosas e a avaliação dos pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz inoculadas ou não inoculadas com *Microdochium oryzae*. Os resultados obtidos indicam que a utilização da energia para os processos fotossintéticos e a capacidade de dissipação do excesso de energia na maquinaria fotossintética foi comprometida durante a infecção, reduzindo o rendimento fotoquímico e induzindo a inibição do aparato fotossintético nas áreas lesionadas, evidenciando que a infecção tinha efeito local sobre a fotossíntese. Houve diminuição das áreas verdes na superfície do tecido foliar, ocasionado pela expansão das lesões e aumento de tecido necrótico. As concentrações de pigmentos fotossintéticos diminuíram significativamente com o progresso da escaldadura o que limitou a absorção da radiação fotossinteticamente ativa.

INTRODUÇÃO

A escaudadura, causada pelo fungo *Microdochium oryzae* ((Hashiola & Yokogi) Samuels & Hallet = *Rhynchosporium oryzae* Hashiola & Yokogi), é uma das principais doenças do arroz sendo encontrada no sudoeste da Ásia, no Japão, na Austrália, no Oeste da África e nas Américas Central e Latina, podendo causar perdas na produção de até 30% (Ou, 1985). A doença causa desuniformidade no estande e diminuição da área fotossinteticamente ativa (Nunes *et al.*, 2004). Além de afetar as folhas, a doença pode acometer o colmo e as panículas, principalmente quando as plantas estão nas fases de perfilhamento e emborrachamento (Prabhu & Filippi, 1997). Os primeiros sintomas foliares são o aparecimento de manchas de coloração verde-oliva, sem margens bem definidas (Filippi *et al.*, 2005). As lesões expandem-se formando sucessões de faixas concêntricas, com alternância das cores marrom-clara e escura e, posteriormente, ocorrem coalescência das lesões, causando necrose e morte das folhas (Filippi *et al.*, 2005). Períodos de alta pluviosidade e de orvalho prolongado, temperaturas variando de 24 e 28°C, alta densidade de plantas e excesso de adubação nitrogenada são condições favoráveis para o progresso da doença (Ou, 1985; Groth, 1992).

A fluorescência de imagem da clorofila *a* é uma ferramenta de importante aplicação para estudos do desempenho fotossintético em plantas infectadas por patógenos, principalmente quando associada a outros métodos não invasivos, como a análise das trocas gasosas melhorando, assim, a capacidade de examinar a heterogeneidade de áreas lesionadas (Baker, 2008). A técnica de fluorescência de imagem da clorofila *a* tem a vantagem de permitir a análise de estresses localizados

em plantas, tais como os que ocorrem em áreas infectadas por patógenos, principalmente em regiões assintomáticas (Iqbal *et al.*, 2012).

A utilização dos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a* em tecidos foliares tem sido utilizada como ferramenta no estudo fotossintético das interações planta-patógeno tais como o feijoeiro-*Colletotrichum lindemuthianum* (Bassanezi *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* (Tao *et al.*, 2003), cevada-*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Swarbrick *et al.*, 2006), milho-*Colletotrichum graminicola* (Behr *et al.*, 2010) e fumo-*Pseudomonas syringae* (Iqbal *et al.*, 2012). Meyer *et al.* (2001), estudando a interação feijoeiro-*Colletotrichum lindemuthianum*, concluíram que, em áreas foliares verdes e aparentemente saudáveis próximas a lesões ocorria inibição da fotossíntese. Bassanezi *et al.* (1997), estudando o mesmo patossistema, verificaram redução na atividade fotossintética nas lesões necróticas de cor marron escuro em folhas de feijoeiro, bem como nas áreas verdes remanescentes. Iqbal *et al.* (2012) verificaram alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em diferentes áreas de uma mesma folha de fumo infectado por *Pseudomonas syringae*.

Neste contexto, uma abordagem a fim de avaliar a diversidade de eventos que ocorrem na área próxima à lesão, numa mesma folha seria conveniente, contribuindo para o entendimento da dinâmica fotossintética na interação arroz-*M. oryzae*. Dessa forma, procurou-se neste estudo investigar os parâmetros fotossintéticos fornecidos pela fluorescência de imagem da clorofila *a* na área lesionada e em áreas próximas à lesão, associando-as às trocas gasosas e à concentração de pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas de arroz inoculadas e não inoculadas com *M. oryzae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas

Plantas de arroz da cultivar Primavera foram crescidas em vasos plásticos contendo 2 dm³ do substrato comercial Tropstrato[®] (Vida Verde, Mogi Mirim, SP) à base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida (1:1:1). Para cada dm³ de substrato, foram adicionados 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Em cada vaso, semearam-se nove sementes de arroz. Após a emergência, deixaram-se três plântulas por vaso. Cada vaso recebeu 50 mL de solução contendo, em mg L⁻¹, 192 KCl; 104,42 K₂SO₄; 150,35 MgSO₄.7H₂O; 61 uréia; 100 NH₄NO₃; 0,27 NH₄MO₇O₂₄.4 H₂O; 1,61 H₃BO₃; 6,67 ZnSO₄.7H₂O; 1,74 CuSO₄.5H₂O; 4,10 MnCl₂.4H₂O; 4,08 FeSO₄.7H₂O e 5 EDTA-bisódico. A solução nutritiva foi aplicada após o desbaste e depois em intervalos de sete dias, até o fim do experimento.

Inoculação das plantas com *M. oryzae*

O isolado de *M. oryzae* foi gentilmente cedido pela professora Gisele Barata da Silva, da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA. O fungo foi preservado em tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar (BDA), coberto por óleo mineral, mantidos em geladeira a 4°C. Vinte e cinco dias antes da inoculação das plantas, pedaços de meio de cultura BDA contendo estruturas do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Quando a colônia do fungo atingiu 3 cm de diâmetro, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo também BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D. por 15 dias (25°C e fotoperíodo de 12 horas). Aos 45 dias após o transplântio, plantas com dez folhas no colmo principal (Matsuo & Hoshikama, 1993) foram inoculadas com *M. oryzae*, utilizando-se discos de meio BDA (0,25 cm²) contendo estruturas do fungo.

Três discos foram equidistantemente colocados na face adaxial da sétima, oitava e nona folha do colmo principal, da base para o ápice, em cada planta e aderido à superfície da folha com uma leve pressão manual. As plantas inoculadas permaneceram em câmara de nevoeiro durante cinco dias à temperatura de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

Avaliação da expansão das lesões

A expansão das lesões da escaldadura foi avaliada na superfície adaxial da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação (hai). Três lesões em uma folha de cada planta por repetição foram medidas (em mm) com auxílio de um paquímetro digital (Worker, USA).

Avaliação das trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i), sob irradiância de $1.200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração ambiente de CO_2 (C_a) de $425 \pm 8 \mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$, foram determinadas com um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400, Nebraska, EUA). As avaliações foram realizadas em áreas pré-determinadas na oitava e na nona folha do colmo principal das plantas de cada repetição às 24, 48, 72, 96 e 120 hai, conforme mostra a Fig. 1a. As leituras foram realizadas entre as 9:00 e 10:30 horas. Antes da realização das leituras, as plantas foram mantidas em ambiente aberto por 30 min.

Determinação das concentrações de clorofila e de carotenóides

Foram coletadas amostras da sétima, oitava e nona folha do colmo principal das plantas de cada repetição dos tratamentos às 24, 48, 72, 96 e 120 hai. As amostras foram coletadas em nitrogênio (N) líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C , até análise. Clorofila a , clorofila b e carotenóides foram extraídos em acetona

a 80% e suas concentrações foram estimadas conforme Lichtenthaler (1987). Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado sob luz verde.

Avaliação da fluorescência de imagem da clorofila *a*

As imagens e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos utilizando a versão MAXI do fluorômetro Imaging-PAM e o software Imaging Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Plantas inoculadas e não inoculadas com *M. oryzae* foram mantidas no escuro por 20 min. Após esse período, as folhas de cada planta foram fixadas individualmente no suporte a uma distância de 18,5 cm da câmera de gravação das imagens digitais de fluorescência CCD (“charge-coupled device”) acoplada ao aparelho. As imagens na resolução de 640×480 pixels, com uma área amostral visível de 24 x 32 mm, foram obtidas. As variáveis de ajuste utilizadas na programação do fluorômetro foram as seguintes: intensidade da luz de medição = 2, frequência = 1, ganho = 7, amortecimento = 2; intensidade do pulso de saturação = 10 e largura = 8. Cada registro de imagem foi iniciado pela determinação dos parâmetros de escuro, primeiramente pela determinação da fluorescência mínima (F_0). Subsequentemente, foi emitido um pulso saturante de luz para determinação da fluorescência máxima (F_m) usado pelo *software* para calcular o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m). A dissipação de energia absorvida por processos não fotoquímicos é máxima quando um pulso de luz é aplicado após uma fase de adaptação ao escuro, permitindo, assim, a obtenção de F_m . Sob luz actínica, os valores do rendimento atual de fluorescência (F_t), da fluorescência máxima na presença de luz (F_m') e da fluorescência mínima (F_0') foram obtidos para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímica (q_p) o qual representa uma estimativa da dissipação fotoquímica (Krause & Weis, 1991).

Outro parâmetro importante para avaliar a variação na eficiência da fotossíntese quando a luz actínica é usada é o rendimento quântico efetivo do fotossistema II, $Y(II)$. Adicionalmente, o rendimento quântico da dissipação regulada ($Y(NPQ)$) e não regulada ($Y(NO)$) de energia do fotossistema II (FSII), foi determinado de acordo com Klughammer & Schreiber (2008). Além disso, a dissipação não fotoquímica (NPQ) foi determinada, medindo-se a proporção de absorção de luz não utilizada no transporte de elétrons (Bilger & Bjorkman, 1990; Oxborough, 2004). Para análise dos valores dos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a*, utilizou-se uma marcação circular de áreas pré-determinadas nas folhas das plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* de, aproximadamente, $0,78 \text{ cm}^2$, as quais foram definidas como: área sadia (S), área assintomática (A), área intermediária a área lesionada (I) e área visualmente lesionada (D) (Fig. 1b). Os parâmetros foram obtidos na oitava e nona folha do colmo principal das plantas de cada repetição dos tratamentos às 24, 48, 72, 96 e 120 hai.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi instalado num delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (plantas inoculadas e não inoculadas com *M. oryzae*) com seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo três plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e teste t ($P \leq 0.05$) utilizando o software SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Expansão de lesões

Os valores da expansão de lesões aumentaram nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* durante o progresso da doença, registrando o valor máximo de 24.5 mm às 120 hai (Fig. 2).

Trocas gasosas

A fotossíntese decresceu significativamente com o avanço da infecção em 32, 52, 60, 64 e 79% às 24, 48, 72, 96 e 120 hai (Fig. 3a). Tendência similar a *A*, foi encontrada para *g_s*, apresentando reduções significativas de 23, 53, 44, 37 e 63% às 24, 48, 72, 96 e 120 hai nos valores das folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* em relação às folhas das plantas não inoculadas (Fig. 3b). Os valores de *E* também reduziram significativamente com o progresso da infecção em 21, 11, 16 e 44% às 24, 48, 96 e 120 hai (Fig. 3c). Para o valor de *C_i* às 24 hai houve aumento significativo nas folhas das plantas não inoculadas em relação às folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae*. Nos demais períodos avaliados, os valores de *C_i* nas plantas não inoculadas foram significativamente inferiores aos valores encontrados nas plantas inoculadas em 3, 5, 12 e 14% às 48, 72, 96 e 120 hai (Fig. 3d).

Concentração de pigmentos

Reduções significativas na concentração de clorofila *a* de 36% às 48 hai, 48% às 72 hai, 50% às 96 hai e 59% às 120 hai (Fig. 5a); de clorofila *b* em 35% às 48 hai, 44% às 72 hai, 56% às 96 e 62% às 120 hai (Fig. 5b), de clorofila total em 36, 48, 51 e 63% às 48, 72, 96 e 120 hai (Fig. 5c) e de carotenóides em 23, 24, 21 e 24% às 48, 72, 96 e 120 hai (Fig. 5d) foram obtidas para as plantas inoculadas com *M. oryzae* em relação às plantas não inoculadas.

Fluorescência de imagem da clorofila *a*

Foram obtidos oito parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a* nas folhas das plantas de arroz durante o processo infeccioso de *M. oryzae* (Figs. 5 e 6). A partir das 24 hai, começou-se a observar sintomas visuais nas imagens de fluorescência da clorofila *a* na superfície do tecido foliar, evoluindo de tecidos saudáveis para o aparecimento de lesões escuras, que se tornavam cada vez maiores, com o progresso da doença. Variações no padrão de cor nas imagens do tecido foliar foram observados para F_0 , F_m , F_v/F_m , q_p , $Y(II)$, $Y(NPQ)$, $Y(NO)$ e $NPQ/4$, variando na escala de cores de 0 (preto) a 100% (rosa) a fim de avaliar a magnitude dos parâmetros.

A coloração alaranjada observada na superfície do tecido foliar para F_0 (Fig. 5a1), evidencia que a concentração de clorofilas e as propriedades ópticas da folha estavam intactas (áreas saudáveis), obtendo-se o maior valor para este parâmetro, enquanto a área lesionada apresentou coloração escura, devido à expansão das lesões, indicando destruição das clorofilas e perda das propriedades ópticas nos tecidos mortos (áreas necrosadas), levando a menores valores de F_0 (Figs. 5a2-a6). Resultados semelhantes foram obtidos para F_m e F_v/F_m , com alterações na coloração das imagens, em que as máximas de F_m e F_v/F_m corresponderam a coloração verde e azul, respectivamente (Figs. 5b1-b6 e 5c1-c6).

A dissipação fotoquímica (q_p) máxima foi obtida quando a superfície do tecido foliar apresentou coloração com matizes verdes (áreas saudáveis). Variações nos tons de verde ao redor da área escura (área necrosada) indicaram pequenas mudanças na dissipação fotoquímica. Não ocorreu dissipação fotoquímica na área escura (área necrosada) das folhas inoculadas (Figs. 5d1-d6).

Para Y(II), Y(NPQ), Y(NO) os maiores valores apresentaram tons de verde nas folhas das plantas (áreas saudias). Perceberam-se variações entre tons de verde e amarelo ao redor da área escura (área necrosada) para os parâmetros Y(II), Y(NPQ); enquanto que para Y(NO) variações nos tons de verde e azul foram observados, indicando pequenas mudanças nos valores destas variáveis. Os menores valores foram obtidos nas áreas escuras (áreas necrosadas) para Y(II), Y(NPQ), Y(NO) (Figs. 6a1-a6, 6b1-b6 e 6c1-c6). NPQ/4 obteve menores valores nas áreas escuras, enquanto nas áreas saudias apresentaram coloração amarelada (Figs. 6d1-d6).

De modo geral, D (Figs. 7 e 8) apresentou redução nos valores dos parâmetros de fluorescência de clorofila *a* avaliados, chegando a zero a partir de 96 hai em quase todos os parâmetros, exceto para Y(NO), cujos valores se elevaram próximos de 1. S e A não apresentaram variações expressivas entre os valores durante o progresso da doença, indicando que as áreas circunvizinhas a D foram pouco afetadas por *M. oryzae*. I apresentou redução nos valores dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em relação à S e A e superiores aos valores encontrados para D, sendo afetada por *M. oryzae*.

Às 120 hai, Tabelas 1 e 2, não houve diferença significativa para F_0 , F_m , F_v/F_m , q_p , Y(NPQ) e NPQ/4 entre S e A. Diferenças significativas foram observadas somente para Y (II) e Y(NO) evidenciando que A permaneceu sadia e pouco afetada pelo patógeno. D diferiu significativamente das demais áreas, com os menores valores para os parâmetros de fluorescência às 120 hai, chegando a valor zero para os parâmetros de q_p e Y(II), indicando a atuação do patógeno em reduzir e inibir por completo a fotossíntese (Tabelas 1 e 2).

DISCUSSÃO

Em folhas inoculadas com *M. oryzae* os valores de A , g_s e E foram menores em relação às folhas das plantas não inoculadas, evidenciando o efeito negativo causado pelo fungo nas trocas gasosas, principalmente em A . Essa limitação pode estar relacionada com a menor concentração de pigmentos fotossintéticos durante o processo infeccioso de *M. oryzae*, uma vez que a menor abertura estomática não reduziu a concentração interna de CO_2 na folha. Os aumentos nos valores da concentração interna de CO_2 nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* podem estar associados à diminuição da área foliar verde e, conseqüentemente, a ocorrência de necrose e possível aumento da respiração da planta e do patógeno, além de limitações nos processos bioquímicos da fotossíntese. Os estômatos das folhas infectadas por *M. oryzae* permaneceram mais fechados, o que levou a uma redução da E .

Segundo Stangarlin & Leite (2008) a redução na fotossíntese de folhas infectadas por patógenos pode ocorrer devido a alterações na abertura e fechamento dos estômatos, dificultando a difusão de CO_2 no mesófilo foliar e redução ou destruição de moléculas de clorofila ou de cloroplastos, que resultam em áreas cloróticas e necróticas. Abo-Foul *et al.* (1996), estudando o patossistema pepino-*Sphaerotheca fuliginea*, relataram que a redução na capacidade fotossintética ocorreu devido à perda de clorofila, danos aos tilacóides e perda do estroma, enquanto para o patossistema soja-*Phakopsora pachyrhizi*, houve redução da eficiência do uso da radiação fotossinteticamente ativa, principalmente devido à perda de clorofila, reduzindo a capacidade da folha em absorver a luz (Kumudini *et al.*, 2008).

Os menores valores de F_0 encontrado em D podem ter sido ocasionados por alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos em decorrência da infecção por *M. oryzae*, comprometendo a eficiência da energia de excitação a partir da antena coletora de luz e danos aos centros de reação do FSII. Reduções nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos nas folhas das plantas inoculadas suporta essa hipótese. Tendência semelhante aos resultados obtidos para F_0 foi obtida para F_m , pois menores valores em D ocorreram durante a expansão das lesões em relação as demais áreas.

Os valores de F_v/F_m foram menores em D, evidenciando dano no aparato fotossintético devido a infecção por *M. oryzae*. Em A, a razão F_v/F_m foi similar à encontrada em S, indicando que o desempenho fotossintético não foi alterado. A máxima eficiência na qual a luz é absorvida pelo FSII para reduzir Q_A , representado por F_v/F_m , é um indicador sensível do desempenho fotossintético das plantas, com valores ótimos, entre 0,75 a 0,85 para a maioria das espécies de plantas (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). Bher *et al.* (2010), estudando a interação milho-*Colletotrichum graminicola*, também encontraram resultados similares para a razão F_v/F_m em áreas sadias e assintomáticas. Por outro lado, Swarbrick *et al.* (2006), estudando interações incompatíveis e compatíveis no patossistema cevada-*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* mostraram, mediante a fluorescência de imagem da clorofila *a*, que a atividade fotossintética foi reduzida nas células colonizadas pelo fungo e também nas células adjacentes apenas para a interação compatível.

Os valores de q_p e de Y(II) obtidos em S e A foram similares durante a expansão das lesões, confirmando que em A a infecção por *M. oryzae* não afetou o rendimento fotossintético. Contrariamente em D, a infecção por *M.oryzae* contribuiu para a inibição completa da fotossíntese. Além do rendimento quântico efetivo do

FSII, demonstrado por Y(II), outros dois tipos de rendimentos quânticos podem ser definidos, os quais são Y(NPQ) e Y(NO) (Kramer *et al.*, 2004). Esses dois parâmetros representam a dissipação regulada e não regulada dos centros de reação do FSII, respectivamente. Y(NPQ) refere-se à dissipação térmica regulada que ocorre no centro de reação do FSII, através do ciclo das xantofilas, sendo induzido pela luz e pelo gradiente de prótons nas membranas dos tilacóides (Kramer *et al.*, 2004). Os maiores valores de Y(NPQ) em S e A em relação aos das demais áreas avaliadas sugerem a ocorrência de dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor, sendo um mecanismo fisiológico de fotoproteção. Por outro lado, em D, os menores valores obtidos para Y(NPQ), pressupõem que a infecção por *M. oryzae* afetou o mecanismo de dissipação de energia, inabilitando essa área de se proteger contra o estresse luminoso, devido à intensa necrose. As menores concentrações de pigmentos fotossintéticos nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* em relação às folhas não inoculadas ao longo das avaliações demonstram que parte do sistema antena e de proteção contra o excesso de energia de excitação foi danificado durante o processo infeccioso por *M. oryzae*, contribuindo para a redução dos valores de Y(NPQ).

Os maiores valores de Y(NO) em D sugerem que tanto a energia de excitação direcionada para a conversão fotoquímica e os mecanismos de regulação da proteção foram ineficientes, sendo um indicativo de que essas áreas foram danificadas pela infecção por *M. oryzae*. Segundo Klughammer & Schreiber (2008), Y(NO) reflete a fração da energia dissipada na forma de calor e fluorescência (perdas constitutivas), principalmente quando os centros de reação do FSII estão fechados (Pool de Q_A reduzido). O incremento observado nos valores de Y(NO) em D indica que a energia que chega ao complexo antena não estaria sendo transmitida para Q_A . Assim, as

imagens permitiram a obtenção dos valores de $Y(NO)$ demonstrando áreas na superfície foliar onde os centros de reação do FSII foram danificados. Valores de $Y(NO)$ semelhantes foram verificados em S e A ao longo das avaliações, indicando que os mecanismos de fotoproteção e regulação de energia de excitação nessas áreas foram eficientes na dissipação do excesso de energia.

Com a diminuição do q_P ocorreu decréscimo em $Y(II)$, concomitantemente com aumento da fotoinibição do FSII, aumentando os valores de $Y(NO)$ enquanto os de $Y(NPQ)$ foram reduzidos. Assim, as áreas afetadas por *M. oryzae* não apresentaram tendência de recuperação.

A dissipação do excesso de energia radiante na forma de calor nos complexos antena do FSII, representado por NPQ/4, foi maior em S e A do que em comparação a D. Apesar dos maiores valores de NPQ/4 para S e A, o balanço de energia de excitação utilizada para melhorar o rendimento fotossintético através do *quenching* fotoquímico não foi afetado. Berger *et al.*, 2007 estudando a interação *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* encontrou menores valores de NPQ/4 em áreas lesionadas do que em relação às áreas de tecido foliar saudáveis.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a fluorescência de imagem da clorofila *a* como uma importante ferramenta a ser utilizada em estudos de desempenho fotossintético em plantas infectadas por patógenos. Em adição, sugerem, que reduções na fotossíntese durante a infecção por *M. oryzae* esteja associada a reduções na concentração de pigmentos. Danos nas estruturas dos cloroplastos e limitações bioquímicas podem ter sido responsáveis pela redução no processo fotossintético e estudos futuros devem se concentrar nos mecanismos associados a essa resposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abo-Foul A, Raskin S, Szejnberga VI, Mander JB, 1996. Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 86, 195-199.

Baker NR, Oxborough K, Lawson T, Morison JI, 2001. High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cell and chloroplast in leaves. *Journal of Experimental Botany* 52, 615–21.

Bassanezi RB, Martins MC, Godoy CV, Amorim L, Bergamim Filho, 1997. Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 22, 520-524.

Behr M, Humbeck K, Hause G, Deising BD, Wirsel SGR, 2010. The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 879-892.

Berger S, Sinha AK, Roitsch T, 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58, 4019-4026.

Bilger W, Björkman O, 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.

Bolhar-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG, 1989. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3, 497-514.

- Filippi MC, Prabhu AS, Silva GB, 2005. Escaldadura do arroz e seu controle. *Circular Técnica 72*, Santo Antônio de Goiás GO. Embrapa Arroz e Feijão.
- Groth D, 1992. Leaf scald. In: Webster R, Gunnel P (Ed). *Compendium of rice diseases*. St. Paul: American Phytopatological Society.
- Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED, Grodzinski B, 2012. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology* 61, 1052-1062.
- Klughammer C, Schreiber U, 2008. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1, 27-35.
- Kramer D M, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE, 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79, 209-218.
- Krause GH, Weis E, 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Boca Raton 42, 313-349.
- Kumudini S, Prior E, Omielan J, Tollenaar M, 2008. Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. *Crop Science* 48, 2343-2350.
- Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of Enzymology* 148, 350-382.
- Matsuo T, Hoshikama K, 1993. *Science of the Rice Plant Morphology*. Tokyo, Japan: Food and Agriculture Policy Research Center.

- Meyer S, Saccardy-Adji F, Rizza F, Genty B, 2001. Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant, Cell and Environment* 24, 947-955.
- Nunes CDM, Ribeiro AS, Terres ALS, 2004. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. In: Gomes AS, Magalhães Jr. AM, Eds. *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica, 579-622.
- Ou SH, 1985. Rice Diseases. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Oxborough K, 2004. Using chlorophyll *a* fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In: Govindjee P G, Eds. *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis*. Dordrecht: Springer, 409-429.
- Prabhu AS, Filippi MC, 1997. Arroz (*Oryza sativa*) controle de doenças. In: Vale FXR, Zambolim L, Eds. *Controle de doenças de plantas*. Viçosa MG. Ministério da Agricultura e Abastecimento 1, 51-81.
- Stangarlin J R, Leite, B, 2008. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P, Eds. *Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 177 - 227.
- Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD, 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell and Environment* 29, 1061-1076.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F, 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 15, 317-330.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m), rendimento quântico máximo do FS II (F_v/F_m) e coeficiente de extinção da fotoquímica (q_p) determinadas nas áreas sadia (S), assintomática (A), área intermediária (I) e área visualmente lesionada (D) em folhas de plantas de arroz às 120 horas após inoculação com *Microdochium oryzae*.

Áreas	F_0	F_m	F_v/F_m	q_p
S	0,077 a	0,418 a	0,817 a	0,446 a
A	0,084 a	0,411 a	0,799 a	0,381 a
I	0,027 b	0,087 b	0,682 b	0,276 b
D	0,009 b	0,011 c	0,189 c	0,000 c
C.V.(%) =	9,35	8,46	7,87	18,29

^a Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^b C.V. = Coeficiente de variação.
($n = 6$)

Tabela 2. Rendimento quântico efetivo do PSII Y(II), rendimento quântico da dissipação regulada Y(NPQ), rendimento quântico da dissipação não regulada Y(NO) e dissipação não fotoquímica NPQ/4 determinadas nas áreas sadia (S), assintomática (A), área intermediária (I) e área visualmente lesionada (D) em folhas de plantas de arroz às 120 horas após inoculação com *Microdochium oryzae*.

Áreas	Y (II)	Y(NPQ)	Y(NO)	NPQ/4
S	0,324 a	0,254 a	0,421 d	0,160 a
A	0,270 b	0,226 ab	0,503 c	0,112 ab
I	0,161 c	0,174 b	0,664 b	0,078 b
D	0,000 d	0,000 d	1,000 a	0,000 c
C.V.(%) =	14,42	23,06	5,91	38,53

^aMédias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^bC.V. = Coeficiente de variação.
($n = 6$)

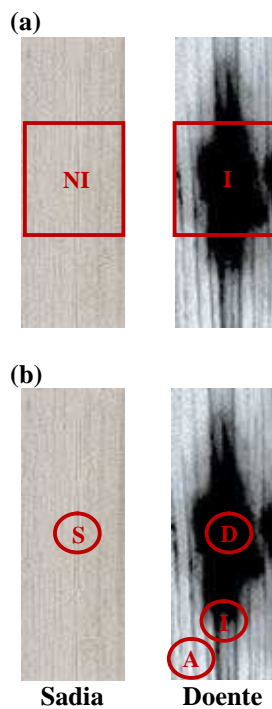


Figura 1. Área não inoculada (NI) e inoculada (I) com *Microdochium oryzae* em folhas de plantas de arroz avaliadas com o analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA) e áreas sadia (S), assintomática (A), intermediária (I) e visualmente não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* avaliadas pelo fluorômetro de imagem da clorofila *a*. As áreas NI e S foram obtidas de folhas de arroz não inoculadas com *M. oryzae*.

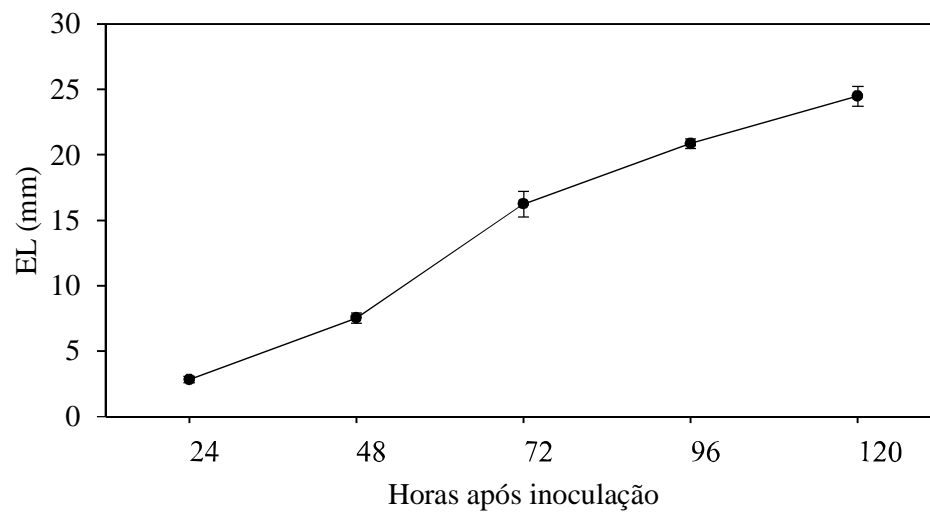


Figura 2. Expansão de lesões (EL) de escaldadura em folhas de arroz inoculadas com *Microdochium oryzae*. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. ($n = 6$)

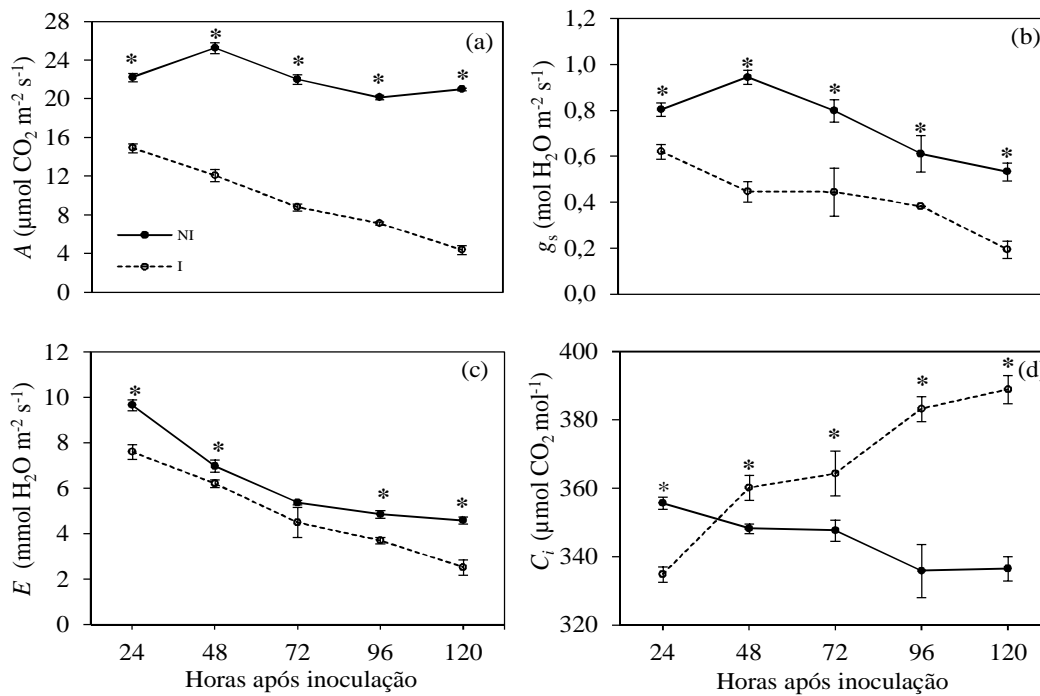


Figura 3. Fotossíntese líquida (A) (a), condutância estomática (g_s) (b), taxa de transpiração (E) (c) e concentração interna de CO_2 (C_i) (d) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

($n = 6$)

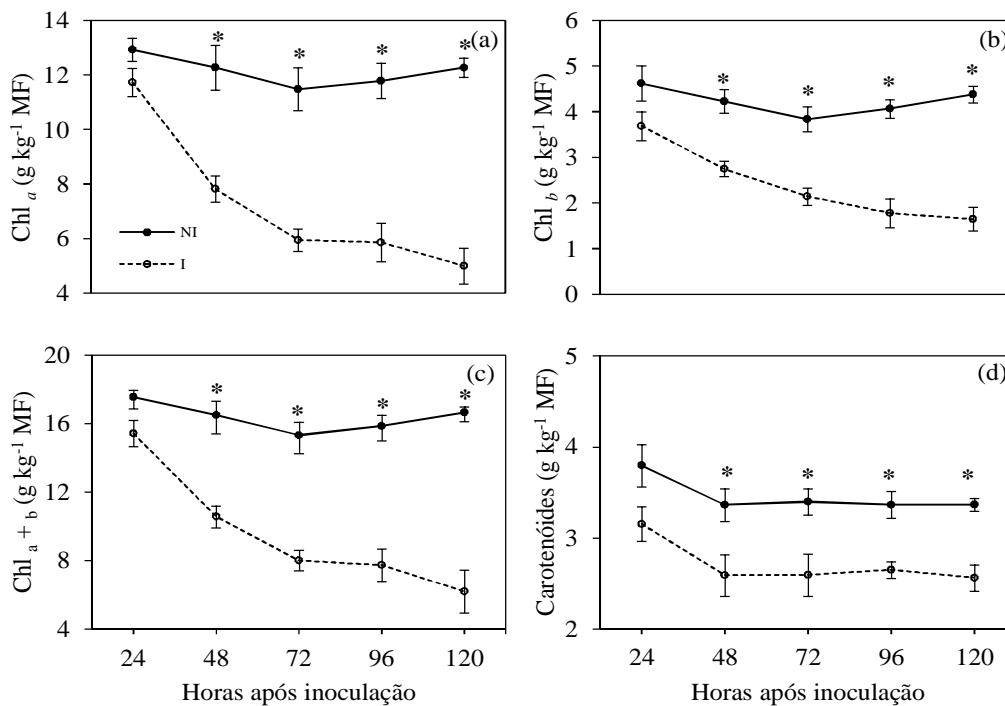


Figura 4. Concentração de clorofila *a* (Chl *a*) (a), clorofila *b* (Chl *b*) (b), clorofila total (Chl *a* + *b*) (c) e carotenóides (d) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. MF = matéria fresca.

(*n* = 6)

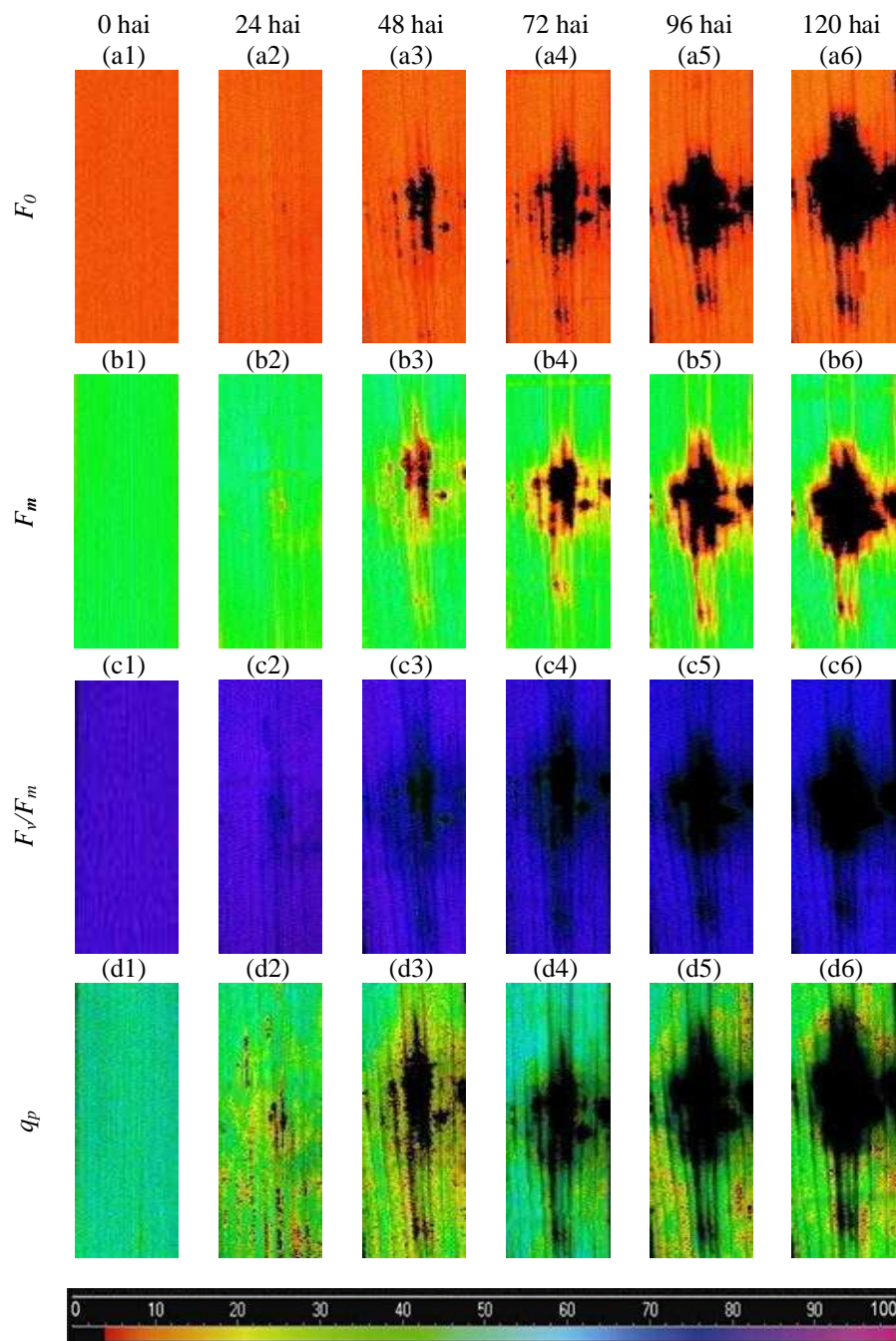


Figura 5. Parâmetros de fluorescência da clorofila a : fluorescência mínima (F_0) (a1-a6), fluorescência máxima (F_m) (b1-b6), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m) (c1-c6) e coeficiente de extinção fotoquímica (q_p) (d1-d6) obtidos de folhas de plantas de arroz às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) com *Microdochium oryzae*.

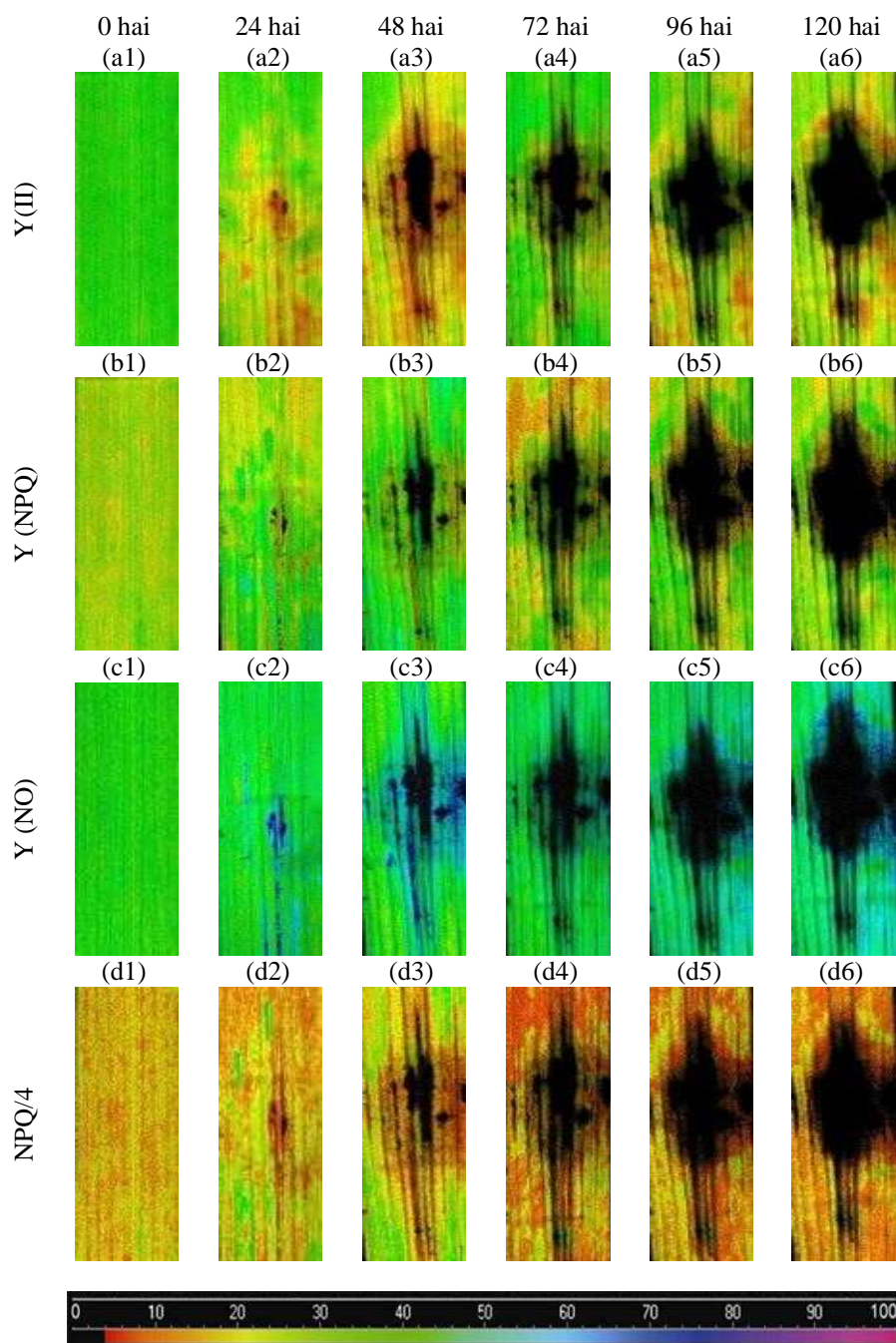


Figura 6. Parâmetros de fluorescência da clorofila a : rendimento quântico efetivo do FSII, YII (a1-a6), rendimento quântico da dissipação regulada, Y(NPQ) (b1-b6), rendimento quântico da dissipação não regulada, Y(NO) (c1-c6) e dissipação não fotoquímica NPQ/4 (d1-d6) obtidos de folhas de plantas de arroz às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) com *Microdochium oryzae*.

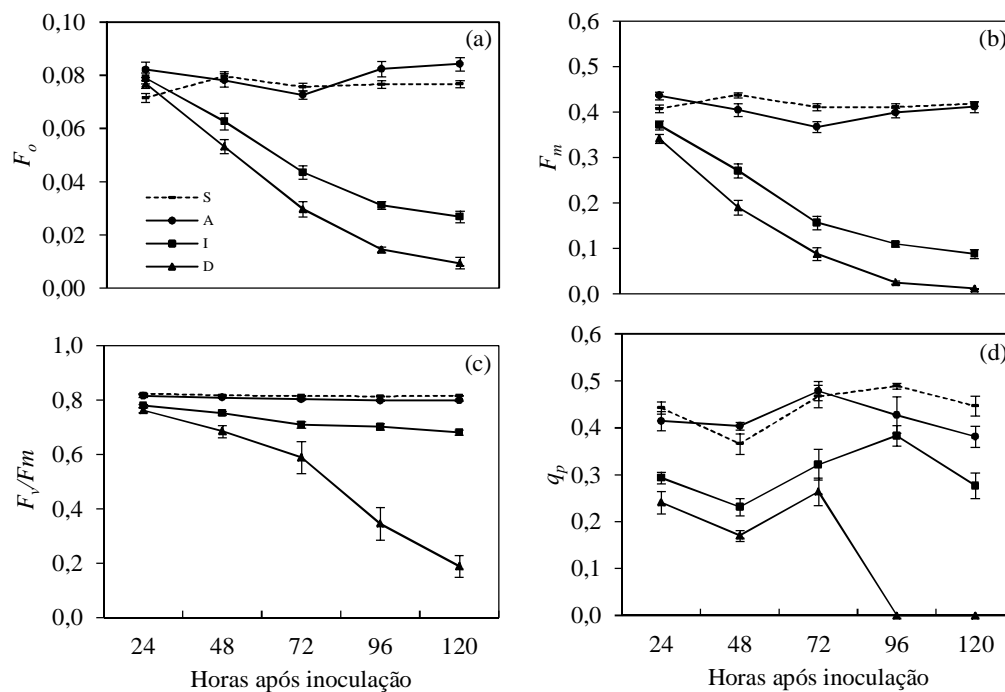


Figura 7. Fluorescência mínima (F_0) (a), fluorescência máxima (F_m) (b), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m) (c) e coeficiente de extinção da fotoquímica (q_p) (d) determinadas na área sadia (S), assintomática (A), área intermediária (I) e área visualmente lesionada (D) em folhas de plantas de arroz às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) com *Microdochium oryzae*. Barras em cada ponto representa o erro padrão da média.

($n = 6$)

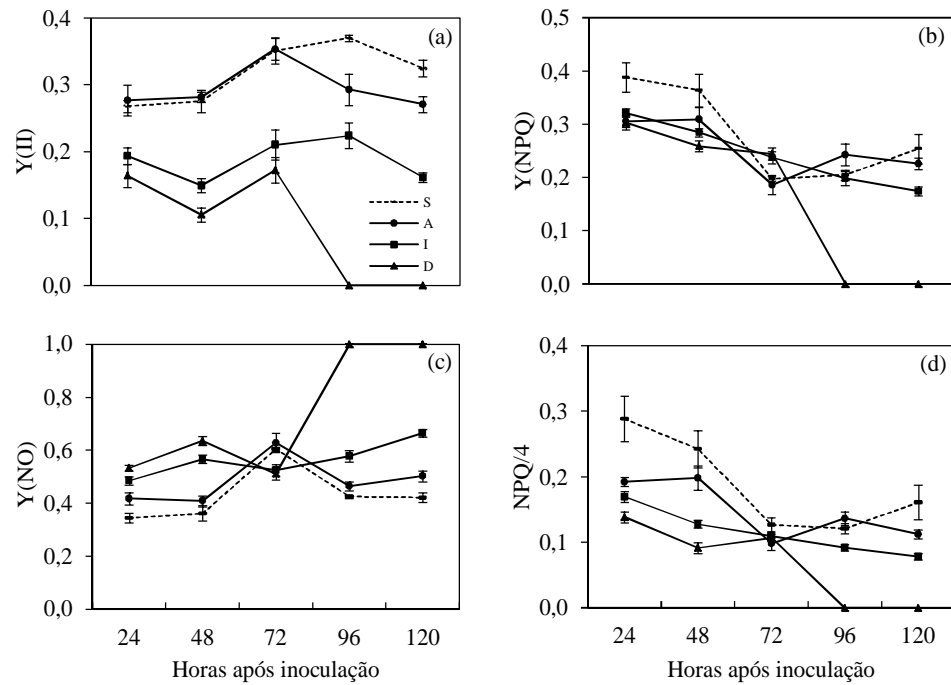


Figura 8. Rendimento quântico efetivo do FSII $Y(II)$ (a), rendimento quântico da dissipação regulada $Y(NPQ)$ (b), rendimento quântico da dissipação não regulada $Y(NO)$ (c) e dissipação não fotoquímica $NPQ/4$ determinadas na área sadia (S), assintomática (A), área intermediária (I) e área visualmente lesionada (D) em folhas de plantas de arroz às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai) com *Microdochium oryzae*. Barras em cada ponto representa o erro padrão da média.

($n = 6$)

Capítulo 2

Alterações no metabolismo antioxidativo e de variáveis fisiológicas em folhas de arroz infectadas por *Microdochium oryzae*

RESUMO

A escaudadura do arroz, causada por *Microdochium oryzae*, é uma das principais doenças do arroz (*Oryza sativa*) no Brasil. Considerando que até o momento, informações sobre interação arroz-*M. oryzae* são escassas, buscou-se, neste trabalho investigar a atividade das enzimas antioxidativas ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR), os danos causados à membrana celular avaliada pela concentração de aldeído malônico (MDA), assim como, as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de pigmentos fotossintéticos, bem como trocas gasosas em folhas de plantas de arroz durante o processo infeccioso de *M. oryzae*. Com o progresso da doença houve redução da fotossíntese, da condutância estomática e da transpiração. Houve também incrementos na concentração interna de CO_2 e redução na concentração de pigmentos fotossintéticos ocasionados pela expansão das lesões, comprometendo a absorção da radiação fotossinteticamente ativa e limitando a fotossíntese.

As atividades das enzimas envolvidas no sistema antioxidativo nas plantas de arroz infectadas por *M. oryzae* aumentaram na tentativa de impedir o acúmulo de H_2O_2 , principalmente APX, POX e GR, não sendo, entretanto, eficientes na remoção do excesso de H_2O_2 , resultando em dano oxidativo. As concentrações de MDA nas plantas inoculadas mantiveram-se elevadas no final do processo infeccioso, como resultado da peroxidação lipídica.

INTRODUÇÃO

A escaudadura, causada pelo fungo *Microdochium oryzae* ((Hashiola & Yokogi) Samuels & Hallet = *Rhynchosporium oryzae* Hashiola & Yokogi) é uma das principais doenças do arroz e é encontrada no sudoeste da Ásia, no Japão, na Austrália, no Oeste da África e nas Américas Central e Latina, podendo causar perdas na produção de até 30% (Ou, 1985). A doença causa desuniformidade no estande e diminuição da área fotossinteticamente ativa (Nunes *et al.*, 2004). Além de afetar as folhas, a doença pode acometer o colmo e as panículas, principalmente quando as plantas estão nas fases de perfilhamento e emborrachamento (Prabhu & Filippi, 1997). O primeiro sintoma dessa doença é o aparecimento de manchas de coloração verde-oliva, sem margens bem definidas, nas folhas (Filippi *et al.*, 2005). As lesões expandem-se formando sucessões de faixas concêntricas, com alternância das cores marrom-clara e escura e, posteriormente, coalescem resultando, em necrose e morte foliar (Filippi *et al.*, 2005). Períodos de alta pluviosidade e de orvalho prolongado, temperaturas variando de 24 e 28°C, alta densidade de plantas e excesso de adubação nitrogenada são as condições favoráveis para o progresso da doença (Ou, 1985; Groth, 1992).

As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses e conseguem modular respostas de defesa de forma a superar tais estresses e retornar ao metabolismo normal (Bolton, 2009). Durante o processo infeccioso de um patógeno, as plantas respondem ativando mecanismos de defesa redirecionando os derivados de carbono do metabolismo primário para o secundário (Bolton, 2009). Inúmeros estudos têm verificado que a infecção por patógenos provoca decréscimo nas taxas fotossintéticas, geralmente associado a danos no aparato fotossintético

(Kumudini *et al.*, 2008, Behr *et al.*, 2010, Iqbal *et al.*, 2012), levando ao aumento da energia de excitação que excede a quantidade necessária ao metabolismo fotossintético (Bassanezi *et al.*, 2000), ocasionando, assim, redução do oxigênio molecular e podendo levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Dentre as ERO's, destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (Yu & Rengel, 1999), os quais são capazes de causar a peroxidação de lipídios (Lima *et al.*, 2002) e a desnaturação de proteínas (Asada, 1999). Além disso, as ERO's também podem danificar os pigmentos fotossintéticos e os ácidos nucleicos (Moller, 2001). Todavia, a formação de ERO's pode exceder a capacidade de sua remoção, culminando, assim, em estresse oxidativo para as plantas (Yu & Rengel, 1999).

Para ocorrer à proteção do aparato fotossintético contra o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo que pode ser alcançado mediante o aumento nos níveis de xantofilas e carotenóides e de outras moléculas pequenas como o ácido ascórbico e a glutathiona, e também pela atuação de várias enzimas antioxidantes (Asada, 1999). No sistema antioxidativo das plantas superiores, as enzimas mais importantes envolvidas nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet -}$, mantendo baixos os níveis desse radical sendo o O_2 e o H_2O_2 os produtos de sua reação; a catalase (CAT), que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , além das enzimas do ciclo do ascorbato-glutathiona, tais como a ascorbato peroxidase (APX), que catalisa a oxidação do ascorbato a monodesidroascorbato (MDHA), usando H_2O_2 como oxidante (Jimenez *et al.*, 2002). O ascorbato oxidado é então reduzido pela glutathiona reduzida, a qual é produzida a partir da glutathiona oxidada, catalisada pela glutathiona redutase (GR) com o consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH) (Apel & Hirt, 2004). Por

fim, as peroxidases (POX) realizam a catálise e a biossíntese de lignina, gerando H_2O_2 a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (Goldberg *et al.*, 1985), e também através da oxidação de compostos fenólicos (Fry, 1986).

A produção de ERO's é uma importante resposta de defesa da planta contra a infecção por patógenos (Magbanua *et al.*, 2007). No entanto, a acumulação de ERO's causado pelo desequilíbrio entre a sua produção e os mecanismos de defesa podem danificar o tecido do hospedeiro (Lima *et al.*, 2002) quando a planta não consegue manter as ERO's celular em níveis toleráveis (Scandalios, 2011). O aumento na capacidade do sistema antioxidativo das plantas de arroz torna-se importante para eliminar as ERO's nos tecidos foliares infectadas por *M. oryzae*. Assim, informações sobre as alterações no sistema antioxidante de folhas de plantas de arroz durante o processo infeccioso de *M. oryzae* tornam-se necessárias para o patossistema. Visando preencher essa lacuna, este estudo objetivou determinar a atividade das enzimas do sistema antioxidativo, à concentração de H_2O_2 e de pigmentos fotossintéticos, os danos à membrana celular e as trocas gasosas em plantas de arroz durante o processo infeccioso de *M. oryzae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas

Plantas de arroz da cultivar Primavera foram crescidas em vasos plásticos contendo 2 dm³ do substrato comercial Tropstrato[®] (Vida Verde, Mogi Mirim, SP) a base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida (1:1:1). Para cada dm³ de substrato, foram adicionados 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Em cada vaso, semearam-se nove sementes de arroz. Após a emergência, deixaram-se três plântulas por vaso. Cada vaso recebeu 50 mL de solução contendo, em mg L⁻¹, 192 KCl; 104,42 K₂SO₄; 150,35 MgSO₄.7H₂O; 61 uréia; 100 NH₄NO₃; 0,27 NH₄MO₇O₂₄.4 H₂O; 1,61 H₃BO₃; 6,67 ZnSO₄.7H₂O; 1,74 CuSO₄.5H₂O; 4,10 MnCl₂.4H₂O; 4,08 FeSO₄.7H₂O e 5 EDTA-bisódico. A solução nutritiva foi aplicada após o desbaste e depois em intervalos de sete dias, até o fim do experimento.

Inoculação das plantas com *M. oryzae*

O isolado de *M. oryzae* foi gentilmente cedido pela professora Gisele Barata da Silva, da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA. O fungo foi preservado em tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar (BDA), coberto por óleo mineral, mantidos em geladeira a 4°C. Vinte e cinco dias antes da inoculação das plantas, pedaços de meio de cultura BDA contendo estruturas do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Quando a colônia do fungo atingiu 3 cm de diâmetro, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo também BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D. por 15 dias (25°C e fotoperíodo de 12 horas). Aos 45 dias após o transplântio, plantas com dez folhas no colmo principal (Matsuo & Hoshikama, 1993) foram inoculadas com *M. oryzae*, utilizando-se discos de meio BDA (0,25 cm²) contendo estruturas do fungo.

Três discos foram equidistantemente colocados na face adaxial da sétima, oitava e nona folha do colmo principal, da base para o ápice, em cada planta e aderido à superfície da folha com uma leve pressão. As plantas inoculadas permaneceram em câmara de nevoeiro durante cinco dias à temperatura de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

Avaliação da expansão das lesões

A expansão das lesões da escaudadura foi avaliada na superfície adaxial da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação (hai). Três lesões em uma folha de cada planta por repetição foram medidas (em mm) com auxílio de um paquímetro digital (Worker, USA).

Avaliação das trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i), sob irradiância de $1.200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração ambiente de CO_2 (C_a) de $425 \pm 8 \mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$, foram determinadas com um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400, Nebraska, EUA). As avaliações foram realizadas em áreas pré-determinadas na oitava e na nona folha do colmo principal das plantas de cada repetição dos tratamentos às 24, 72 e 120 hai. As leituras foram realizadas entre as 9:00 e 10:30 horas. Antes da realização das leituras, as plantas foram mantidas em ambiente aberto por 30 min.

Determinação das concentrações de clorofila e de carotenóides

Foram coletadas amostras da sétima, oitava e nona folha do colmo principal das plantas de cada repetição, da base para o ápice, às 120 hai. As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até análise. Clorofila a , clorofila b e carotenóides foram extraídos em acetona a 80% e suas

concentrações estimadas conforme Lichtenthaler (1987). Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado sob luz verde.

Determinação das atividades das enzimas do sistema antioxidativo

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX, 0,3 g de fragmentos de folhas foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 2% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g, por 15 min, a 4°C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas.

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade da enzima GR, 0,3 g de fragmentos foliares foram macerados conforme descrito acima. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM, *DL*-ditioteitol 1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 2% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado conforme descrito anteriormente.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 µL do extrato foliar em 1,94 mL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo *et al.*, 1993). A reação ocorreu a 25°C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis & Ries, 1977). As amostras controle tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm utilizando-se mistura de reação mantida no escuro

por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano & Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H₂O₂ 1 mM e ascorbato 0,8 mM, em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato foliar e a atividade foi medida pela oxidação do H₂O₂ dependente do ascorbato a 290 nm, durante 1 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano & Asada, 1981) foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 µL do extrato foliar a 1,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, glutationa oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM preparado em tampão Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,5), segundo Carlberg & Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância foi medido a 340 nm, a 30°C, durante o primeiro min de reação. A atividade da GR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer & Halliwell, 1976) e foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak & Marschner (1992). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm, durante 1 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹

cm^{-1} (Anderson *et al.*, 1995) foi usado para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com a metodologia proposta por Kar & Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 μL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 420 nm, durante 1 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance & Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)

Amostras da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 96 e 120 hai e mantidas em nitrogênio líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas a -80°C até análise. O dano oxidativo nas células das folhas foi estimado como sendo a concentração de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) reativo e expresso como equivalentes de malondialdeído (MDA) de acordo com Cakmak & Horst (1991). Um total de 100 mg de tecido foliar foi moído até obtenção de um pó fino usando almofariz e um pistilo com nitrogênio líquido. O pó fino foi homogeneizado em 2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foram colocados para reagir com 1,5 mL de solução de TBA (0,5% em TCA a 20%) durante 30 min em banho de água em ebulição a 95°C. Após este

período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9.000 g durante 10 min e a absorvância específica foi determinada a 532 nm. A absorvância não específica foi estimada a 600 nm e subtraída do valor da absorção específica. O coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath & Packer, 1968) foi utilizado para calcular a concentração de MDA, a qual foi expressa em nmol g^{-1} de matéria fresca (MF).

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Amostras de 100 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g, durante 15 min, a 4°C (Kuo & Kao, 2003). Foram adicionados 100 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em um volume de 2 mL (Gay & Gerbicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorvância determinada a 560 nm. Os controles do reagente e dos extratos foliares foram preparados paralelamente e subtraídos da amostra. A concentração de H_2O_2 , estimada com base em curva padrão de H_2O_2 , foi expressa em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ MF.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae*) e seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo três plantas. Os dados de cada variável foram submetidos à análise de variância e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste *t* ($P \leq 0.05$) usando SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Expansão de lesões

Os valores da expansão de lesões aumentaram nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* durante o progresso da doença, registrando o valor máximo de 25.6 mm às 120 hai (Fig. 1).

Trocas gasosas

Nas plantas inoculadas *A* foi significativamente reduzida às 72 e 120 hai em 73 e 80%, respectivamente, em comparação com as plantas não inoculadas (Fig. 2a). Reduções significativas de 20, 71 e 77%, respectivamente, às 24, 72 e 120 hai ocorreram para g_s nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 2b). *E* foi significativamente reduzida em 55 e 77% às 72 e 120 hai, respectivamente, nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 2c). Houve aumento de 3 e 17% às 72 e 120 hai, respectivamente, para os valores de C_i nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 2d).

Concentração de pigmentos

Reduções significativas de 63, 59, 62 e 24% nas concentrações de clorofila total, clorofilas *a*, clorofila *b*, e de carotenóides ocorreram às 120 hai nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 3).

Atividades das enzimas do sistema antioxidativo

Houve aumentos significativos na atividade da SOD de 21 e 19% às 48 e 120 hai, respectivamente, nas plantas inoculadas em comparação com as plantas não inoculadas com *M. oryzae* (Fig. 4a).

Aumentos significativos na atividade da APX de 49% às 48 hai, 32% às 72 hai, 23% às 96 hai e 14% às 120 hai, foram obtidos nas plantas inoculadas em

relação às plantas não inoculadas (Fig. 4b). Para GR aumentos significativos de 61% às 48 hai, 82% às 72 hai, 80% às 96 hai e 41% às 120 hai, foram obtidos nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A atividade da CAT foi significativamente maior nas plantas inoculadas em comparação às plantas não inoculadas às 48 e 72 hai (Fig. 4d). Às 120 hai, a atividade da CAT foi significativamente menor nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 4d).

A atividade da POX aumentou significativamente em 83% às 48 hai, 84% às 72 hai, 67% às 96 hai e 79% às 120 hai nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 4e).

Concentração de MDA

Aumentos significativos na concentração de MDA em plantas inoculadas com *M. oryzae* às 72, 96 e 120 hai foram observados (Fig. 5a).

Concentração de H₂O₂

Houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* das 24 às 120 hai, com os maiores valores ocorrendo para as plantas inoculadas (Fig. 5b).

DISCUSSÃO

No presente estudo, os valores de A , g_s , e E foram menores nas folhas infectadas por *M. oryzae*, evidenciando o efeito negativo do patógeno nas trocas gasosas, principalmente em A . Essa limitação pode estar relacionada com a redução da abertura estomática e a menor concentração de pigmentos fotossintéticos encontrados nas plantas inoculadas com *M. oryzae*. Os aumentos nos valores da concentração interna de CO_2 nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* podem estar associados à diminuição da área foliar verde e, conseqüentemente, a ocorrência de necrose e possível aumento da respiração da planta e do patógeno, além de limitações nos processos bioquímicos da fotossíntese. Os estômatos das folhas infectadas por *M. oryzae* permaneceram mais fechados, o que levou a uma redução da E . Segundo Stangarlin & Leite (2008) a redução na fotossíntese de folhas infectadas por patógenos pode ocorrer devido a alterações na abertura e fechamento dos estômatos, dificultando a difusão de CO_2 no mesófilo foliar e redução ou destruição de moléculas de clorofila ou de cloroplastos, que resultam em áreas cloróticas e necróticas.

Considerando que a fixação de carbono foi reduzida nas plantas infectadas por *M. oryzae*, a energia de excitação excedente resultante da luz absorvida pelos cloroplastos durante a fotossíntese deve ser dissipada para evitar danos fotooxidativos nos tecidos foliares. Com efeito, a redução fotossintética do O_2 , que pode ocorrer através da fotorespiração e da via Mehler-peroxidase, pode proporcionar proteção ao excesso de luz, atuando na dissipação do excesso de energia do aparato fotossintético (Wihelm & Selmar, 2011). No entanto, estes mecanismos levam à produção de ERO's, especialmente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Biehler &

Fock, 1996; Smirnoff, 1995). Assim, aumentos na capacidade do sistema antioxidante são necessárias para eliminar ERO's, observada nas plantas infectadas por *M. oryzae*.

Nas folhas das plantas inoculadas com *M. oryzae* houve aumentos significativos na atividade da SOD no início (48 hai) e no final do processo infeccioso (120 hai). Assim, a maior atividade da SOD pode ter contribuído para a proteção contra o estresse oxidativo nas folhas das plantas inoculadas. De qualquer forma, esperava-se um aumento na produção de H_2O_2 com aumento da atividade da SOD, o qual pode estar acoplado à rápida remoção de H_2O_2 por outros sistemas de eliminação, minimizando assim, a fitotoxicidade do H_2O_2 (Perl *et al.*, 1993). Aumentos na atividade da SOD pode também, ser uma estratégia para a colonização de patógenos, uma vez que o excesso de ERO's é removido (Ehsani-Mohaddam *et al.*, 2006). Altas concentrações de ERO's nas células do hospedeiro podem beneficiar alguns patógenos fúngicos facilitando a colonização do tecido e absorção de nutrientes (Govrin & Levine, 2000). Kuzniak & Sklodowska (2005) notaram que em tomate a atividade da SOD aumentou durante a fase inicial da infecção por *B. cinerea*, diminuindo à medida que as lesões necróticas apareceram, enquanto em trigo, a atividade da SOD aumentou em folhas infectadas por *P. oryzae* em relação à das folhas saudas (Debona *et al.*, 2012).

A atividade da APX aumentou nas plantas inoculadas com *M. oryzae* em relação às plantas não inoculadas. Aumentos nos níveis dos transcritos de *apx* e na atividade da enzima durante as interações planta-patógeno têm sido bem documentados na literatura (El-Zahabi *et al.*, 1995; Huckelhoven *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2002; Harrach *et al.*, 2008; Mohaghegh *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012). No caso do patossistema arroz-*M. oryzae*, apesar da atividade da APX ter sido

significativamente aumentada, a concentração de H_2O_2 durante o processo infeccioso manteve-se elevada, o que pode ter contribuído para aumentar os danos causados pelo fungo no tecido foliar.

Assim como a APX, a atividade da GR foi aumentada na tentativa em reduzir o estresse oxidativo decorrente da infecção por *M. oryzae*. Essas enzimas são componentes do ciclo da ascorbato-glutationa, participando juntamente com a APX, redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) na remoção do excesso de H_2O_2 e de outras ERO's (Foyer *et al.*, 1997; Mittler, 2002). Apesar de desempenharem papel detrimental no sistema antioxidativo das plantas, a relação delas com a resistência das plantas contra patógenos ainda não está bem elucidada. El-Zahabi *et al.* (1995) não encontraram diferença na atividade da GR nas folhas de três cultivares de cevada infectadas com isolados avirulentos e virulentos de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*.

Entre as enzimas envolvidas na remoção do excesso de H_2O_2 , a CAT desempenha um papel fundamental (Mittler, 2002). Aumentos na concentração de H_2O_2 nas folhas infectadas por *M. oryzae* pode estar associado com a redução na atividade da CAT durante a infecção. Sabe-se, que a redução na atividade da CAT aumenta, em geral, a resistência da planta ao ataque por patógenos na tentativa de manter elevadas concentrações de H_2O_2 (Magbanua *et al.*, 2007). Assim, o papel de CAT na interação planta-patógeno parece ser mais complexo do que no caso de um estresse de natureza abiótica (Kuzniak & Sklodowska, 2005). Vanacker *et al.* (1998) estudando o patossistema cevada-*Blumeria graminis*, observaram aumento na atividade da CAT durante todo o processo infeccioso, enquanto em folhas de tomate, a atividade da CAT foi aumentada durante a fase inicial da infecção por *Botrytis*

cinerea e diminuiu após o aparecimento de lesões necróticas (Kuzniak & Sklodowska, 2005).

A atividade da POX foi importante na tentativa de reduzir o estresse oxidativo decorrente da infecção por *M. oryzae*. Além do envolvimento da POX na remoção de H₂O₂, esta enzima desempenha um papel importante na defesa das plantas à infecção por patógenos, principalmente por estar envolvida na lignificação dos tecidos (Rauyaree *et al.*, 2001). Debona *et al.* (2012) verificaram que a atividade da POX foi importante na defesa de plantas de trigo contra o estresse oxidativo causado pela infecção por *Pyricularia oryzae*.

A extensão dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo, estimado pela concentração de MDA nas plantas de arroz em resposta a infecção por *M. oryzae* pode ser estimada pelos produtos da peroxidação dos lipídios da membrana plasmática (Mandal *et al.*, 2008). Durante o processo infeccioso por *M. oryzae* houve aumentos na concentração de H₂O₂ e possivelmente, de outras ERO's, o que acabou por aumentar a concentração de MDA. Assim, o aumento na capacidade do sistema antioxidativo das plantas de arroz torna-se importante para eliminar as ERO's nos tecidos foliares infectados por *M. oryzae*.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo mostram que a infecção por *M. oryzae* afetou a fisiologia das plantas de arroz. A capacidade de fixação de CO₂ foi reduzida durante a infecção a qual esteve associada a menor concentração de pigmentos fotossintéticos. O sistema antioxidativo das plantas infectadas por *M. oryzae* funcionou a taxas aumentadas na tentativa de impedir a acumulação de ERO's que por ventura acabou por não remover, com eficiência, o excesso de H₂O₂ resultando em danos oxidativos. Pesquisas futuras devem se concentrar no estudo do sistema antioxidativo de arroz a fim de desempenhar um papel fundamental no

desenvolvimento de marcadores bioquímicos que podem ser utilizados em programas de melhoramento para selecionar cultivares resistente ou tolerante a serem cultivadas em áreas epidêmicas de escaldadura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal GK, Jwa N S, Rakwal R, 2002. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione-S-transferases. *Plant Science* 163, 1153-1160.

Anderson D, Prasad K, Stewart R, 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109, 1247-1257.

Apel K, Hirt H, 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.

Asada K, 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular* 50, 601-639.

Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Berger R D, 2002. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Journal of Phytopathology* 150, 37-47.

Beauchamp C, Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.

Behr M, Humbeck K, Hause G, Deising BD, Wirsel SGR, 2010. The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 879-892.

- Biehler K, Fock, HP, 1996. Evidence for the contribution of the Mehler peroxidase reaction in dissipation of excess electrons in drought stressed wheat. *Plant Physiology* 112, 265-272.
- Bolton, MD, 2009. Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 487-497.
- Cakmak I, Marschner H, 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology* 98, 1222-1227.
- Cakmak L, Horst WJ, 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology* 83, 463-468.
- Chance B, Maehley, AC, 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2, 764-775.
- Debona D, Rodrigues FA, Rios JÁ, Nascimento KJT, 2012. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102, 1121-1129.
- Del Longo OT, Gonzalez CA, Pastori GM, Trippi VS, 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell and Physiology* 34, 1023-1028.
- El-Zahabi HM, Gullner G, Kirali Z, 1995. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host pathogen interactions. *Phytopathology* 85, 1225-1230.
- Ehsani-Moghaddam, B., Charles, M. T., Carisse, O., and Khanizadeh, S. 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *Journal of Plant Physiology* 163, 147-153.

- Filippi MC, Prabhu AS, Silva GB, 2005. *Escaldadura do arroz e seu controle*. Circular Técnica. Goiânia: Embrapa CNPAF.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM, 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100, 241-254.
- Foyer CH, Halliwell B, 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Fry SC, 1986. Cross-linking of matrix polymers in growing cell wall of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165-186.
- Gay C, Gerbicki JM, 2000. A critical evaluation of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284, 217-220.
- Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59, 309-314.
- Goldberg R, Lê T, Catesson AM, 1985. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 36, 503-510.
- Govrin EM, Levine A, 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Groth D, 1992. Leaf scald. In: Webster R, Gunnell P (Eds). *Compendium of Rice Diseases*. St. Paul: The American Phytopathological Society.
- Harrach BD, Fodor J, Pogány M, Preuss J, Barna B, 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121, 21-33.

- Heath RL, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics* 125, 189-198.
- Huckelhoven R, Dechert C, Trujillo M, Kogel KH, 2001. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*. 47, 739-748.
- Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED, Grodzinski B, 2012. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology* 61, 1052-1062.
- Jimenez A, Gomez JM, Navarri E, Sevilla F, 2002. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 515-520.
- Kar M, Mishra D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57, 315-319.
- Kumudini S, Prior E, Omielan J, Tollenaar M, 2008. Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. *Crop Science* 48, 2343-2350.
- Kuo MC, Kao CH, 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in rice leaves. *Planta* 46, 149-152.
- Kuzniak E, Sklodowska M, 2005. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* 222, 192-200.

- Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of Enzymology* 148, 350-382.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME, 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47, 239-247.
- Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS, 2007. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Molecular Plant Microbe Interactions* 20, 697-706.
- Mandal S, Mitra A, Mallick N, 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 72, 56-61.
- Matsuo T, Hoshikama K, 1993. *Science of the Rice Plant Morphology*. Tokyo, Japan: Food and Agriculture Policy Research Center.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Mohaghegh P, Khosgoftarmanesh AH, Shirvani M, 2011. Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. *Plant Disease* 95, 455-460.
- Moller IM, 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 561-591.
- Nakano Y, Asada K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell and Physiology* 22, 867-880.

Nunes CDM, Ribeiro AS, Terres ALS, 2004. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. In: Gomes AS, Magalhães Jr. AM, Eds. *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica, 579-622.

Ou SH, 1985. Rice Diseases. Slough, UK: Common wealth Agricultural Bureau.

Prabhu AS, Filippi MC, 1997. Arroz (*Oryza sativa*) controle de doenças. In: Vale FXR, Zambolim L, Eds. *Controle de doenças de plantas*. Viçosa MG. Ministério da Agricultura e Abastecimento 1, 51-81.

Perl A, Perl-Treves R, Galili S., Aviv D, Shalgi E, Malkin S, Galun E, 1993. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics* 85:568-576.

Rauyaree P, Choi W, Fang E, Blackmon B, Dean R, 2001. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology* 2, 347-354.

Resende SR, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira RM, Chaves ARM, DaMatta FM, 2012. Leaf gas Exchange and oxidative stress in soghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102, 892-898.

Scandalios JG, 2011. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* 40, 28-38.

Smirnoff N, 1995. *Antioxidant systems and plant response to the environment*. In: Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. N. Smirnoff (Ed.) BIOS Scientific Publishers, Oxford, 17-243.

Stangarlin J R, Leite, B, 2008. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P, Eds. *Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 177 - 227.

Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH, 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117, 1103-1114.

Wihelm C, Selmar D, 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 168, 79-87.

Yu Q, Rengel Z, 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupines. *Plant Science* 142, 1-11.

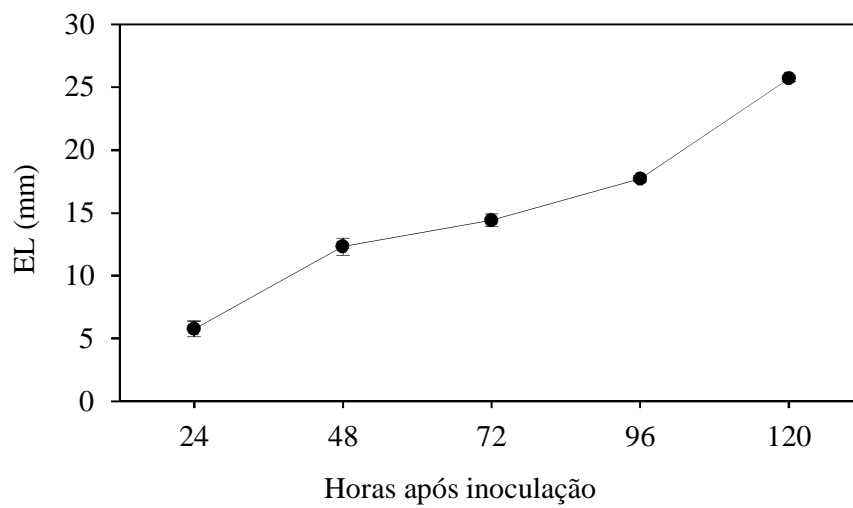
FIGURAS

Figura 1. Expansão de lesões (EL) de escaldadura em folhas de arroz inoculadas com *Microdochium oryzae*. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

($n = 6$)

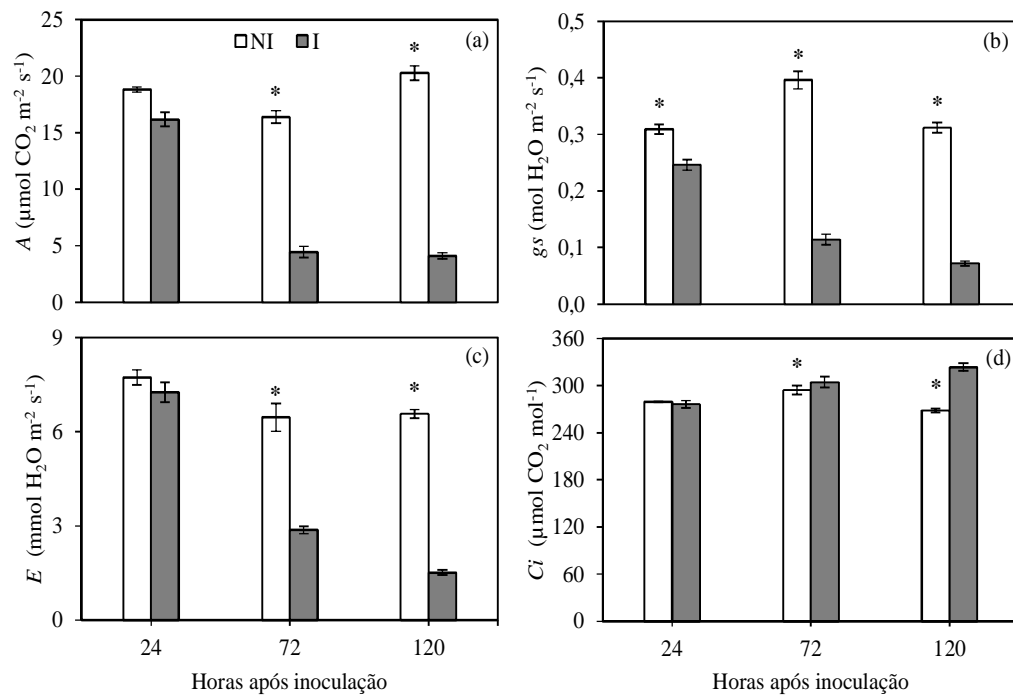


Figura 2. Fotossíntese líquida (A) (a), condutância estomática (g_s) (b), taxa de transpiração (E) (c) e concentração interna de CO_2 (C_i) (d) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (NI) com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

($n = 6$)

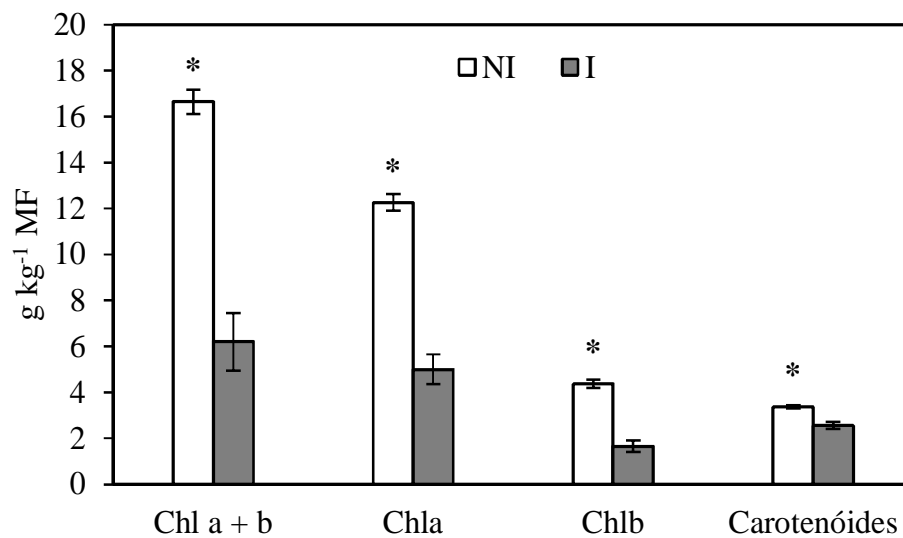


Figura 3. Concentrações de clorofila total (Chl $a + b$), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), e de carotenóides em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* há 120 horas após a inoculação. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. MF = matéria fresca.

($n = 6$)

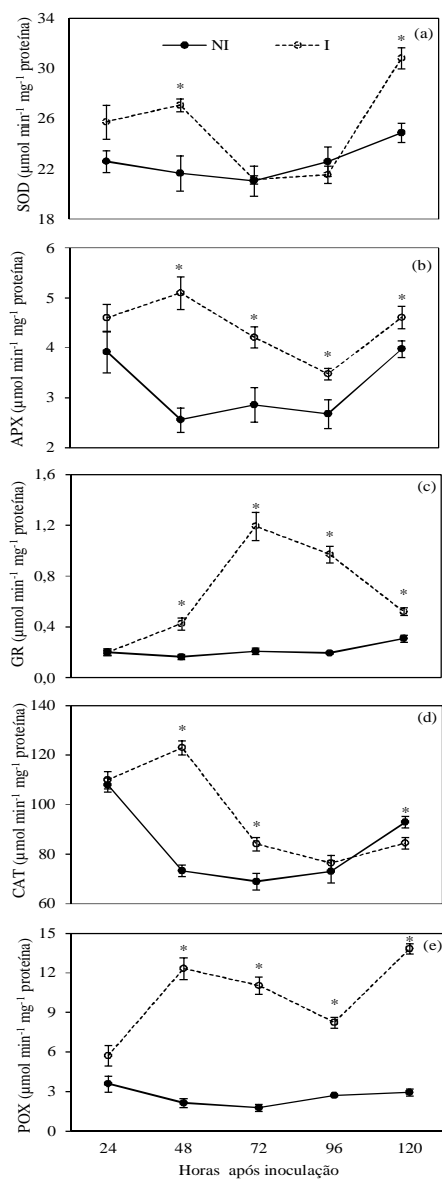


Figura 4. Atividades específicas das enzimas dismutases do superóxido (SOD) (a) peroxidase do ascorbato (APX) (b), redutase da glutathiona (GR) (c), catalases (CAT) (d) e peroxidases (POX) (e) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

($n = 6$)

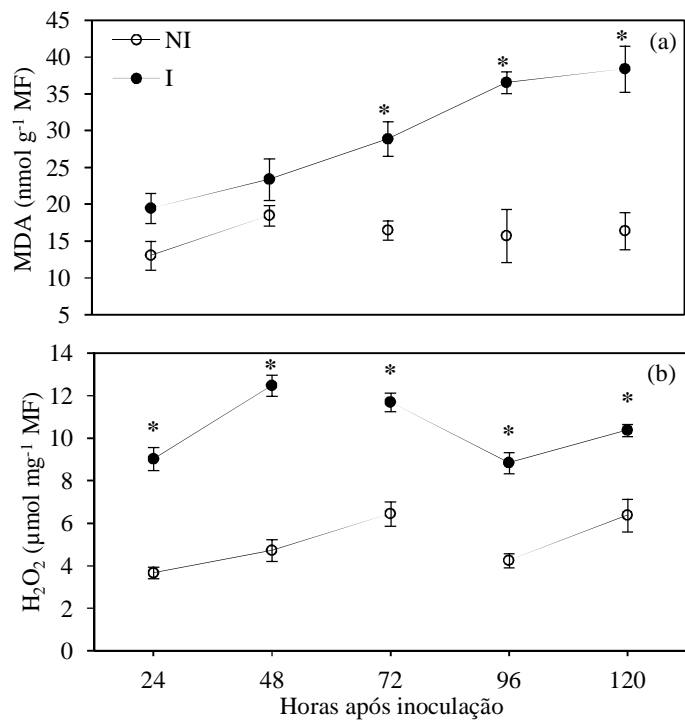


Figura 5. Concentrações de malondialdeído (MDA) (a), e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (b) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (NI) com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação seguidas de asteriscos (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. MF = matéria fresca.

(*n* = 6)

Capítulo 3

Trocas gasosas e fluorescência de imagem da clorofila *a* em folhas de plantas de arroz supridas com silício e infectadas por *Microdochium*

oryzae

RESUMO

Tem sido verificado que o silício (Si) desempenha um papel importante na resistência de plantas contra patógenos, mas os mecanismos exatos de atuação permanecem obscuros. Poucos são os trabalhos na literatura que dão ênfase ao papel do Si sobre a atividade fotossintética em interações patógeno-hospedeiro. Sendo assim, buscou-se, neste trabalho, investigar o efeito do Si sobre as trocas gasosas, a fluorescência de imagem da clorofila *a* e a concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz infectadas por *Microdochium oryzae*, agente causal da escaaldadura. Para esta finalidade, plantas de arroz da cultivar Primavera foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mmol L⁻¹ de Si e não inoculadas ou inoculadas com *M. oryzae*. A infecção por *M. oryzae* reduziu o rendimento fotossintético, o qual esteve associado com a menor concentração de pigmentos fotossintéticos, evidenciando que a infecção teve efeito local sobre a fotossíntese. Na presença de Si, a atividade fotossintética e a eficiência de utilização da energia luminosa e sua conversão em energia química foram potencializados, conforme demonstrado pelos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a*, independente da inoculação com *M. oryzae*. Deste modo, o presente estudo evidencia que o Si é um elemento importante na tentativa de melhorar o rendimento fotossintético em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*.

INTRODUÇÃO

A escaudadura, causada pelo fungo *Microdochium oryzae* ((Hashiola & Yokogi) Samuels & Hallet = *Rhynchosporium oryzae* Hashiola & Yokogi), é uma das principais doenças do arroz, podendo causar perdas na produção de até 30% (Ou, 1985). A doença causa desuniformidade no estande e diminuição da área fotossinteticamente ativa (Nunes *et al.*, 2004). Além de afetar as folhas, a doença pode acometer o colmo e as panículas, principalmente quando as plantas estão nas fases de perfilhamento e emborrachamento (Prabhu & Filippi, 1997). Os primeiros sintomas da escaudadura consistem no aparecimento de manchas de coloração verde-oliva, sem margens bem definidas, nas folhas (Filippi *et al.*, 2005). As lesões expandem-se formando sucessões de faixas concêntricas, com alternância das cores marrom-clara e escura e, posteriormente, ocorrem coalescência das lesões, causando necrose e morte das folhas (Filippi *et al.*, 2005). Períodos de alta pluviosidade e de orvalho prolongado, temperaturas variando de 24 e 28°C, alta densidade de plantas e excesso de adubação nitrogenada são condições favoráveis para a ocorrência de epidemias da doença (Ou, 1985; Groth, 1992).

Apesar de o silício (Si) não ser considerado um elemento essencial para as plantas, seu efeito benéfico no crescimento e na resistência a doenças é bem documentado na literatura (Datnoff *et al.*, 2007). Pesquisas recentes têm apresentado evidências de um papel ativo do Si no controle de doenças de plantas, atuando como potencializador de defesas ou estimulando rotas metabólicas que culminam na produção de compostos antimicrobianos (Bélanger *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004, 2005; Xavier Filha *et al.*, 2011; Fortunato *et al.*, 2012). O Si também

desempenha um papel fundamental na redução de danos causados por vários tipos de estresses abióticos em uma ampla gama de espécies de plantas (Ma & Yamaji, 2008).

Quando as plantas são infectadas por patógenos, a atividade fotossintética e o crescimento são afetados negativamente (Dan Gao *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012; Dallagnol *et al.*, 2012). A maioria dos estudos têm demonstrado que a infecção das plantas por patógenos causa diminuição da fotossíntese (Meyer *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2004; Behr *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2012) e danos ao aparato fotossintético (Abo-Foul *et al.*, 1996; Lichtenthaler & Miehe, 1997; Kumudini *et al.*, 2008). A utilização dos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a* e das trocas gasosas em tecidos foliares tem sido utilizada como ferramenta no estudo fotossintético das interações patógeno-hospedeiro tais como feijoeiro-*Colletotrichum lindemuthianum* (Bassanezi *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* (Tao *et al.*, 2003), cevada-*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Swarbrick *et al.*, 2006), *Eucalytus urophylla*-*Puccinia psidii* (Alves *et al.*, 2011), *Austrocedrus chilensis*-*Phytophthora austrocedrae* (Vélez *et al.*, 2012) e fumo-*Pseudomonas syringae* (Iqbal *et al.*, 2012), melhorando, assim, a capacidade de examinar a heterogeneidade dos tecidos lesionados (Baker, 2008). Até o momento, nenhuma informação sobre o efeito do Si na atividade fotossintética de plantas de arroz infectadas por *M. oryzae* está disponível na literatura. Sendo assim, buscou-se, neste estudo, apresentar as primeiras evidências do efeito do Si durante o processo infeccioso de *M. oryzae* avaliado por meio dos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a*, das trocas gasosas e da concentração de pigmentos fotossintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas

Plantas de arroz da cultivar Primavera foram crescidas em vasos plásticos contendo 5 dm³ de solução nutritiva modificada de Hoagland & Arnon (1950), constituída de: 1,0 mmol L⁻¹ KNO₃; 0,25 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mmol L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,30 µmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 µmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 µmol L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 µmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,1 µmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 µmol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 µmol L⁻¹ EDTA bisódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410) (Ma *et al.*, 2002), foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol de Si/L (+Si).

Inoculação das plantas com *M. oryzae*

O isolado de *M. oryzae* foi gentilmente cedido pela professora Gisele Barata da Silva, da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA. O fungo foi preservado em tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar (BDA), coberto por óleo mineral, mantidos em geladeira a 4°C. Vinte e cinco dias antes da inoculação das plantas, pedaços de meio de cultura BDA contendo estruturas do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Quando a colônia do fungo atingiu 3 cm de diâmetro, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo também BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D. por 15 dias (25°C e fotoperíodo de 12 horas). Aos 45 dias após o transplântio, plantas com dez folhas no colmo principal (Matsuo & Hoshikama, 1993) foram inoculadas com *M. oryzae*, utilizando-se discos de meio BDA (0,25 cm²) contendo estruturas do fungo.

Três discos foram equidistantemente colocados na face adaxial da sétima, oitava e nona folha do colmo principal, da base para o ápice, em cada planta e aderido na superfície da folha com uma leve pressão. As plantas inoculadas permaneceram em câmara de nevoeiro durante cinco dias à temperatura de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

Determinação da concentração foliar de Si

Amostras da sétima, oitava e nona folha do colmo principal das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas às 120 hai, lavadas em água destilada e secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70°C , até atingirem peso constante. Posteriormente, as folhas, sem bainha, foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 20 mesh, para determinação da concentração foliar de Si, conforme Korndörfer *et al.* (2004).

Avaliação da expansão das lesões

A expansão das lesões da escaldadura foi avaliada na superfície adaxial da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai). Três lesões em uma folha de cada planta por repetição foram medidas (em mm) com auxílio de um paquímetro digital (Worker, USA).

Avaliação das trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i), sob irradiância de $1.200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração ambiente de CO_2 (C_a) de $403 \pm 15 \mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$, foram determinadas com um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400, Nebraska, EUA). As avaliações foram realizadas na oitava e na nona folha, da base para o ápice, do colmo principal das plantas da

repetição de cada tratamento, às 24, 48, 72, 96 e 120 hai. As leituras foram realizadas entre as 9:00 e 10:30 horas. Antes da realização das leituras, as plantas foram mantidas em ambiente aberto por 30 min.

Avaliação da fluorescência de imagem da clorofila *a*

As imagens e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos utilizando a versão MAXI do fluorômetro Imaging-PAM e o software Imaging Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Plantas inoculadas (120 hai) e não inoculadas com *M. oryzae* foram mantidas no escuro por 20 min. Após esse período, a oitava e a nona folha do colmo principal das plantas das repetições de cada tratamento foram fixadas individualmente no suporte a uma distância de 18,5 cm da câmera de gravação das imagens digitais de fluorescência CCD (“charge-coupled device”) acoplada ao aparelho para a obtenção dos parâmetros fotossintéticos. As imagens, na resolução de 640×480 pixels, com uma área amostral visível de 24×32 mm foram obtidas das folhas. As variáveis de ajuste utilizadas na programação do fluorômetro foram as seguintes: intensidade da luz de medição = 2, frequência = 1, ganho = 7, amortecimento = 2; intensidade do pulso de saturação = 10 e largura = 8. Cada registro de imagem foi iniciado pela determinação dos parâmetros de escuro sendo a fluorescência mínima (F_0) determinada primeiramente. Subsequentemente, foi emitido um pulso saturante de luz para determinação da fluorescência máxima (F_m) usado pelo *software* para calcular o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m). A dissipação de energia absorvida por processos não fotoquímicos é mínima quando um pulso de luz é aplicado após uma fase de adaptação ao escuro permitindo, assim, a obtenção de F_m . Sob luz actínica, os valores do rendimento atual de fluorescência (F_t), da fluorescência máxima na presença da luz (F_m') e da fluorescência mínima (F_0') foram obtidos para que o coeficiente de

extinção fotoquímica (q_p) fosse calculado, o qual representa uma estimativa da dissipação fotoquímica (Krause & Weiss, 1991).

Outro parâmetro importante para avaliar a variação na eficiência da fotossíntese quando a luz actínica é usada é o rendimento quântico efetivo do fotossistema II, $Y(II)$. Adicionalmente, o rendimento quântico da dissipação regulada ($Y(NPQ)$) e não regulada ($Y(NO)$) de energia do fotossistema II (FSII) foi determinado de acordo com Klughammer & Schreiber (2008). Além disso, a dissipação não fotoquímica (NPQ) foi determinada, medindo-se a proporção de absorção de luz não utilizada no transporte de elétrons (Oxborough, 2004). Para análise dos valores dos parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila *a*, utilizou-se uma marcação circular de aproximadamente $0,78 \text{ cm}^2$ nas folhas das plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* às 120 hai.

Determinação das concentrações de clorofila e de carotenóides

Foram coletadas amostras da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, do colmo principal das plantas da repetição de cada tratamento às 24, 48, 72, 96 e 120 hai. Amostras dessas mesmas folhas de plantas não inoculadas com *M. oryzae* (0 hai) também foram coletadas. As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até análise. Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides foram extraídos em acetona a 80% e suas concentrações estimadas de acordo com Lichtenthaler (1987). Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado sob luz verde.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2×2 , com seis repetições. Os fatores estudados foram: doses de Si (0 e 2 mmol L^{-1} de Si) e plantas inoculadas e não inoculadas com *M. oryzae*. Cada

unidade experimental foi constituída por um vaso contendo cinco plantas de arroz. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t ($P \leq 0.05$) utilizando o software SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Concentração foliar de Si

A concentração foliar de Si aumentou significativamente nas plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* supridas com esse elemento em relação às plantas com ausência de Si na solução nutritiva (Fig. 1).

Expansão das lesões

Reduções significativas de 21% às 72 hai, 16% às 96 hai e de 18% às 120 hai no tamanho das lesões ocorreu para as plantas supridas com Si em comparação com as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 2). Nas folhas das plantas não supridas com Si, as lesões foram maiores, com intensa clorose e apresentaram coalescência, ao contrário do que foi observado nas folhas das plantas supridas com Si (Fig. 3).

Trocas gasosas

Nas plantas não inoculadas e supridas com Si, houve aumentos significativos em *A* de 6, 10 e 15%, respectivamente, às 72, 96 e 120 hai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4a). Aumentos significativos de 11, 37, 27, 49 e 71% em *A*, às 24, 48, 72, 96 e 120 hai, respectivamente, também foram observados nas plantas inoculadas e supridas com Si em comparação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4b).

Nas plantas não inoculadas, supridas ou não supridas com Si, apenas às 96 hai houve diferença significativa entre as médias para a *gs* (Fig. 4c). Nas plantas inoculadas, a presença de Si não alterou significativamente a *gs* durante o período infeccioso (Fig. 4d).

As plantas não inoculadas e supridas com Si apresentaram aumentos significativos em E de 19% às 72 hai, 16% às 96 hai e de 35% às 120 hai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig 4e). Nas plantas inoculadas e supridas com Si, aumentos de 19% às 24 hai, 30% às 48 hai e 15% às 72 hai em E foram observados em relação às plantas não supridas com Si (Fig. 4f).

Nas plantas não supridas com Si, houve aumento significativo nos valores de C_i em 2, 5 e 4%, respectivamente às 72, 96 e 120 hai para as plantas não inoculadas (Fig. 4g) e de 10, 9, 13, 17%, respectivamente, às 48, 72, 96 e 120 para as plantas inoculadas em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 4h).

Fluorescência de imagem da clorofila a

Nas plantas não inoculadas e supridas com Si, houve aumentos significativos de 4% para F_o , 5% para F_m , 2% para F_v/F_m , 34% para q_p , 44% para $Y(II)$ e 13% para $Y(NO)$ em relação as plantas não supridas com esse elemento. Aumentos significativos em 46% para $Y(NPQ)$ e de 27% para $NPQ/4$ ocorreram nas plantas não inoculadas e não supridas com Si em comparação com as plantas supridas com esse elemento (Figs. 6a-6h). Nas plantas inoculadas e supridas com Si, houve aumentos significativos de 42% para F_o , de 43% para F_m , de 6% para F_v/F_m , de 20% para q_p e de 19% para $Y(II)$ em relação as plantas não supridas com Si (Figs. 6a-6e). Nas plantas supridas com Si e inoculadas os valores $Y(NPQ)$, $Y(NO)$ e $NPQ/4$ não foram alterados (Figs. 6f-6h).

Variações no padrão de cor das imagens obtidas do tecido foliar ocorreram para os parâmetros de fluorescência avaliados com base numa escala de cores variando de 0 (preto) a 100 (rosa). F_o foi máximo quando a superfície do tecido foliar apresentou coloração alaranjada, evidenciando a concentração de clorofila e as propriedades ópticas da folha não foram alteradas, enquanto no tecido lesionado por

M. oryzae observou-se coloração escura (área necrótica), indicando destruição das clorofilas e perda das propriedades ópticas no tecido lesionado, o que acarretou em menores valores de F_0 (Figs. 7a1-a4). Resultados semelhantes aos obtidos para F_0 foram também obtidos para F_m e F_v/F_m com alterações na coloração das imagens em que os máximos valores de F_m e F_v/F_m , corresponderam, respectivamente, a coloração verde claro e azul escuro (Figs. 7b1-b4 e 7c1-c4).

Nas plantas não inoculadas e supridas com Si, houve aumentos em q_p evidenciado pela coloração verde claro obtido nas folhas (Fig. 7d1). Nas plantas não inoculadas e não supridas com Si, os valores mínimos de q_p corresponderam à coloração com matizes alaranjados e pequenas pontuações escuras (Fig. 7d2). Nas plantas inoculadas, supridas ou não supridas com Si, pequenas mudanças na dissipação fotoquímica foram observadas na região adjacente ao tecido que apresentou coloração escura (área necrótica) pelo fato das imagens das folhas apresentaram coloração do amarelo a matizes de verde (Figs. 7d3 e 7d4).

Nas plantas não inoculadas e supridas com Si, houve aumento significativo de Y(II) em comparação às plantas não supridas com esse elemento, ocorrendo o máximo valor na coloração verde claro (Fig. 8a1). Nas folhas das plantas não inoculadas e não supridas com Si, obteve-se coloração nas imagens do verde ao avermelhado, indicando decréscimo nos valores de Y(II) (Fig. 8a2).

Para o valor de Y(NO) obteve-se coloração verde nas folhas das plantas não inoculadas, supridas ou não com Si (Figs. 8c1 e 8c2), sendo que, na presença de Si, houve aumento significativo no valor de Y(NO) em relação às plantas não supridas com Si (Fig. 6g). Nas plantas não inoculadas, a ausência de Si na solução nutritiva contribuiu para o aumento significativo no valor de Y(NPQ) em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 6f), fato evidenciado pela coloração verde nas

imagens das folhas (Figs. 8b1 e 8b2). Aumento significativo no valor de NPQ/4 também ocorreu nas plantas não inoculadas e não supridas com Si em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 6h) devido à coloração das imagens variarem, do verde até matizes alaranjados (Figs. 8d1 e 8d2).

Nas imagens de folhas das plantas inoculadas, variações de coloração de azul ao alaranjado na região adjacente ao tecido de coloração escura (área necrótica) foram observadas para os parâmetros Y(NPQ), Y(NO) e NPQ/4, indicando pequenas mudanças nos seus valores (Figs. 8b3-b4, 8c3-c4 e 8d3-d4). Não foi observada nenhuma diferença significativa nos valores dos parâmetros Y(NPQ), Y(NO) e NPQ/4 nas plantas inoculadas, supridas ou não com Si (Figs. 6f-h).

Concentração de pigmentos

Na presença de Si, houve aumentos significativos na concentração de clorofila *a* de 19% às 0 hai, 22% às 48 hai, 49% às 96 hai e 48% às 120 hai (Fig. 5a); de clorofila *b* em 23% às 24 hai, 23% às 48 hai e 52% às 120 hai (Fig. 5b) e de clorofila total em 20, 22, 42 e 49% às 0, 48, 96 e 120 hai em relação às plantas não supridas com esse elemento. Para a concentração de carotenóides, aumentos significativos de 26% às 0 hai, 19% às 24 hai e 13% às 72 hai ocorreram para as plantas supridas com Si em relação as plantas não supridas com esse elemento (Fig. 5d).

DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que a infecção por *M. oryzae* reduziu *A*. Porém, na presença de Si, a atividade fotossintética das plantas não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* foi potencializada. Dallagnol *et al.* (2012) estudando a interação arroz-*Bipolares oryzae* encontraram aumentos significativos em *A* nas plantas não inoculadas e inoculadas, supridas com Si, em relação às plantas não supridas com esse elemento, evidenciando a importância do Si na fisiologia do arroz pelo aumento da produção de carboidratos e de açúcares no metabolismo vegetal. Detman *et al.* (2012) demonstraram que o Si melhorou a produtividade da cultura do arroz, mesmo sob condição não estressante, aumentando também a eficiência do uso de nitrogênio na planta pelo estímulo da remobilização de aminoácidos. Brunings *et al.* (2009), por sua vez, verificaram expressão diferencial em 221 genes em plantas de arroz infectadas por *Magnaporthe oryzae* e supridas com Si em relação às plantas controle (ausência de Si), levando a suspeita de estarem envolvidos na resposta de defesa ao estresse, fornecendo a evidência de um papel ativo do Si na atividade metabólica do arroz, como um sinal molecular na via que conduz ao aumento de resistência à doença.

Os menores valores de *A* nas folhas das plantas inoculadas e não supridas com Si pode ser atribuído à perda de pigmentos fotossintéticos, os quais são parte integrante do complexo antena de captação de luz para o processo fotossintético (Taiz & Zeiger, 2009). Danos causados nesses pigmentos afetam a atividade fotossintética das plantas (Larcher, 2005). Abo-Foul *et al.* (1996) estudando o patossistema pepino-*Sphaerotheca fuliginea*, relataram que a redução na capacidade fotossintética ocorreu devido à perda de clorofila, danos aos tilacóides e perda do

estroma. No patossistema soja-*Phakopsora pachyrhizi*, Kumudini *et al.* (2008) observaram redução na eficiência do uso da radiação fotossinteticamente ativa devido, principalmente, à perda de clorofila, o que reduziu a capacidade das folhas em absorverem luz. Ranganathan *et al.* (2006), por sua vez, verificaram que a atividade do FSII e a concentração de clorofila em folhas de plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *Magnaporthe grisea* foram comparáveis ao observado em plantas saudas. Como os valores de g_s em plantas supridas ou não supridas com Si não se alteraram, a redução dos valores de E nas folhas das plantas inoculadas e não supridas com Si pode ser atribuído à massiva colonização das células do mesófilo pelo fungo, resultando na secagem do tecido necrosado. É sabido que a E diminui em tecido foliar infectado por patógeno devido o fechamento estomático, colonização dos espaços intercelulares e esporulação pelos estômatos (Duniway & Durbin, 1971; Spotts & Ferree, 1979).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a fornecem informações úteis sobre a atividade do FS II e possíveis alterações no metabolismo fotossintético de folhas doentes (Schnabel *et al.*, 1998). Os maiores valores para os parâmetros de fluorescência de imagem da clorofila a , F_0 , F_m , F_v/F_m , q_p e $Y(II)$ nas plantas supridas com Si e inoculadas ou não com *M. oryzae* mostram que o rendimento fotossintético foi potencializado por esse elemento.

Nas plantas inoculadas e não supridas com Si, os menores valores de F_0 evidenciam que ocorreram alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos comprometendo, assim, a eficiência da energia de excitação a partir da antena coletora de luz e danos aos centros de reação do FSII. Reduções nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos nas folhas das plantas inoculadas suporta essa hipótese. Tendência semelhante aos resultados obtidos para F_0 ocorreu para F_m . Assim, parece

ocorrer uma deficiência na fotorredução da quinona A (Q_A) e no fluxo de elétrons entre os fotossistemas. De Las Rivas & Barber (1997) relataram que a perda de atividade do FSII está provavelmente associada com a diminuição da capacidade de reoxidação das quinonas resultando em menor eficiência no transporte de elétrons para o fotossistema I (FSI).

A máxima eficiência na qual a luz é absorvida pelo FSII para reduzir Q_A , representa por F_v/F_m , é um indicador sensível do desempenho fotossintético das plantas, com valores ótimos entre 0,75 a 0,85 para a maioria das espécies (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). Nas plantas não supridas com Si, os valores de F_v/F_m foram abaixo do ótimo, evidenciando dano no aparato fotossintético durante o processo infeccioso de *M. oryzae*. Na presença de Si, houve aumento na razão F_v/F_m , indicando a importância desse elemento para o incremento da fotossíntese. Dan Gao *et al.* (2011) observaram que a presença de Si na solução nutritiva contribuiu para o aumento nos valores de F_v/F_m em plantas de arroz inoculadas com *Magnaporthe oryzae* enquanto que nas plantas não inoculadas, os valores de F_v/F_m não sofreram alteração na presença desse elemento.

O desempenho fotossintético em plantas supridas com Si pode ser evidenciado pelo rendimento quântico efetivo do FSII e pelo *quenching* fotoquímico representado, respectivamente, por $Y(II)$ e q_p . Os maiores valores observados para esses dois parâmetros nas plantas supridas com Si, não inoculadas e inoculadas com *M. oryzae* fornecem um indicativo de que esse elemento estimulou a fotossíntese nas plantas, além de fornecer uma estimativa do transporte de elétrons do FSII para o FSI (Klughamer & Schreiber, 2008).

Além do rendimento quântico efetivo do FSII demonstrado por $Y(II)$, outros dois tipos de rendimentos quânticos podem ser definidos, os quais são $Y(NPQ)$ e

Y(NO) (Kramer *et al.*, 2004). Esses dois parâmetros representam, respectivamente, a dissipação regulada e não regulada dos centros de reação do FSII. Y(NPQ) refere-se à dissipação térmica regulada que ocorre no centro de reação do FSII através do ciclo das xantofilas, sendo induzido pela luz e pelo gradiente de prótons nas membranas dos tilacóides (Klughammer & Schreiber, 2008). Os maiores valores de Y(NPQ) observado nas plantas não inoculadas e não supridas com Si, permite inferir sobre a ocorrência de uma maior dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor como um mecanismo fisiológico de fotoproteção ao contrário do que foi observado para as plantas supridas com Si. Desse modo, é plausível inferir que na presença de Si, as plantas passaram a utilizar uma maior fração de energia de excitação para o Y(II) ao invés de dissipá-la na forma de calor aumentando, assim, o rendimento fotossintético.

Y(NO) refere-se à fração de energia dissipada na forma de calor e fluorescência (perdas constitutivas) principalmente quando os centros de reação do FSII estão fechados (Pool de Q_A reduzido) (Klughammer & Schreiber, 2008). O incremento observado nos valores de Y(NO) para as plantas não inoculadas e supridas com Si indica que a energia que chega ao complexo antena não estaria sendo transmitida para Q_A . Apesar dos maiores valores de Y(NO) para as plantas supridas com Si, o balanço de energia de excitação utilizada para melhorar o rendimento fotossintético não foi afetado. Os maiores valores observados para NPQ/4 nas plantas não inoculadas e não supridas com Si, indica haver menor aproveitamento da energia de excitação para o *quenching* fotoquímico, a qual é dissipada na forma de energia luminosa. Ao contrário, os menores valores de NPQ/4 encontrado nas plantas não inoculadas, permitiram-nos a deduzir que a eficiência de

utilização da energia luminosa e sua conversão em energia química foi maior nas plantas supridas com Si, aumentando a eficiência da atividade fotossintética.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o Si potencializou a atividade fotossintética em plantas de arroz não inoculadas e inoculadas com *M oryzae*. No entanto, é importante notar que o mecanismo exato pelo qual isto é conseguido, até o momento, é desconhecido. Assim, nosso trabalho confirma que o Si é um elemento importante na melhora do rendimento fotossintético em plantas de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Foul A, Raskin S, Szejnberga VI, Mander JB, 1996. Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 86, 195-199.
- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, Da Matta FM, Alfenas AC, 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 1831-1839.
- Bassanezi RB, Martins MC, Godoy CV, Amorim L, Bergamim Filho, 1997. Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 22, 520-524.
- Bélanger RR, Benhamou N, Menzies JG, 2003. Evidence of an active role of silicon (Si) in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). *Phytopathology* 93, 402-412.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T, 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Plant Physiology* 122, 419-428.
- Bolhar-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG, 1989. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3, 497-514.
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst K, 2009. Differential gene expression of rice in responses to silicon and the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology* 155, 161-170.

- Dan Gao, Cai K, Chen J, Luo S, Zeng R, Yang J, Zhu X, 2011. Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 675-682.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Chaves ARM, Vale FXR, DaMatta FM, 2012. Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicone uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* 62, 120-129.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW, 2007. *Silicon and plant disease*. In: Mineral Nutrition and Plant Disease. Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM, Eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 233-243.
- De Las Rivas J, Barber J, 1997. Structure and thermal stability of photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36, 8897-8903.
- Detmann KC, Araújo WL, , Martins SCV, Sanglard LMVP, Reis JV, Detmann E, Rodrigues FA, Nunes-Nesi A, Fernie AR, DaMatta FA, 2012. Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced. *New Phytologist* 196, 752-762.
- mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice
- Duniway JM, Durbin RD, 1971. Some effects of *Uromyces phaseoli* on the transpiration rate and stomatal response of bean leaves. *Phytopathology* 61, 114-119.
- Epstein E, 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 641-664.
- Filippi MC, Prabhu AS, Silva GB, 2005. *Escaldadura do arroz e seu controle*. Circular Técnica. Goiânia: Embrapa NPAF.
- Fortunato AA, Rodrigues FA, Nascimento KJT, 2012. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to Fusarium Wilt potentiated by silicon. *Phytopathology* 102, 957-966.

Groth D, 1992. Leaf scald. In: Webster R, Gunnell P (Ed). *Compendium of rice diseases*. St. Paul: American Phytopathological Society.

Hoagland DR, Arnon DI, 1950. The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347, 1-32.

Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED, Grodzinski B, 2012. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology* 61, 1052-1062.

Larcher W, 2004. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima, 531p.

Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A, 2004. Análise de Silício: Solo, Planta e Fertilizante. Uberlândia, Brazil: Universidade Federal de Uberlândia, Boletim Técnico.

Klughammer C, Schreiber U, 2008. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1, 27-35.

Kumudini S, Prior E, Omielan J, Tollenaar M, 2008. Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. *Crop Science* 48, 2343-2350.

Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce R, Packer L, (Eds.) *Methods Enzymology*. New York: Academic Press Inc. p. 350-82.

Lichtenthaler HK, Miehe JA, 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2, 316-320.

Ma JF, Takahashi E. 2002. *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 41-55.

Meyer S, Saccardy-Adji F, Rizza F, Genty B, 2001. Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant, Cell and Environment* 24, 947-955.

Nunes CDM, Ribeiro AS, Terres ALS, 2004. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. In: Gomes AS, Magalhães Jr. AM, Eds. *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 579-622.

Ou SH, 1985. *Rice Diseases*. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau.

Oxborough K, 2004. Using chlorophyll *a* fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In: Govindjee P G, Eds. *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis*. Dordrecht: Springer, 409-429.

Prabhu AS, Filippi MC, 1997. Arroz (*Oryza sativa*) controle de doenças. In: Vale FXR, Zambolim L, Eds. *Controle de doenças de plantas*. Viçosa MG. Ministério da Agricultura e Abastecimento 1, 51-81.

Ranganathan S, Suvarchala V, Rajesh YBRD, Prasad MS, Padmakumari AP Voleti SR, 2006. Effects of silicon sources on its deposition, chlorophyll content, and disease and pest resistance in rice. *Biologia Plantarum* 50, 713-16.

Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira RM, Chaves ARM, DaMatta FM, 2012. Leaf gas exchange and oxidative stress in soghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102, 892-898.

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

Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA, 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-

Magnaporthe grisea interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 144-59.

Schnabel G, Strittmatter G, Noga G, 1998. Changes in photosynthetic electron transport in potato cultivars with different field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Journal of Phytopathology* 146, 205-210.

Spotts RA, Ferree DC, 1979. Photosynthesis, transpiration and water potential of apple leaves infected by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 69, 717-719.

Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD, 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell and Environment* 29, 1061-1076.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F, 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 15, 317-330.

Taiz L, Zeiger E, 2009. *Fisiologia vegetal*. 4 Ed. Porto Alegre: Artemed, 848 p.

Vélez ML, Silva PV, Troncoso OA, Greslebin AG, 2012. Alteration of physiological parameters of *Austrocedrus chilensis* by the pathogen *Phytophthora austrocedare*. *Plant Pathology* 61, 877-888.

Xavier Filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR, 2011. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* 40, 38-38.

FIGURAS

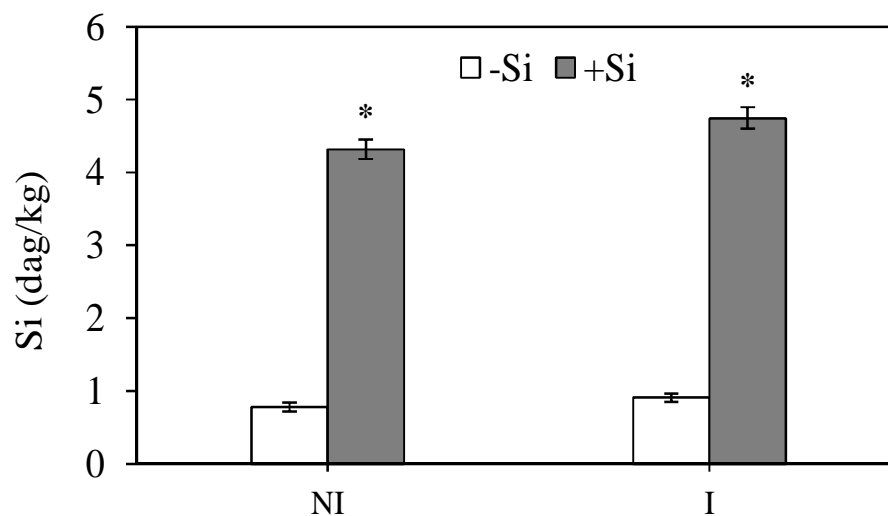


Figura 1. Concentração foliar de silício (Si) em plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Erro padrão da média está representado em cada barra.

(n = 6)



Figura 2. Sintomas da escaldadura em folhas de plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L^{-1} de Si.

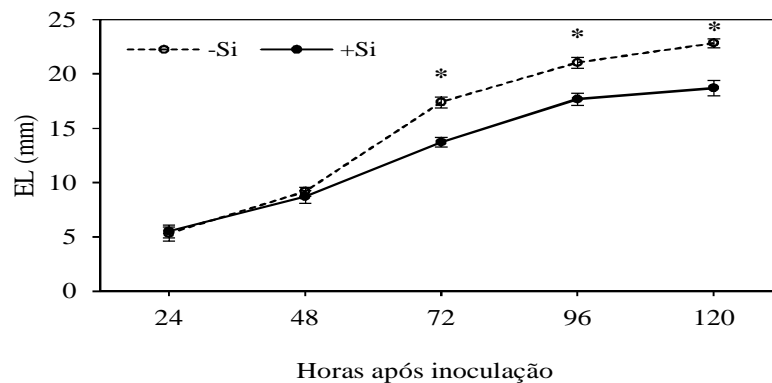


Figura 3. Expansão de lesões (EL) da escaldadura em folhas de plantas de arroz inoculadas com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

(n = 6)

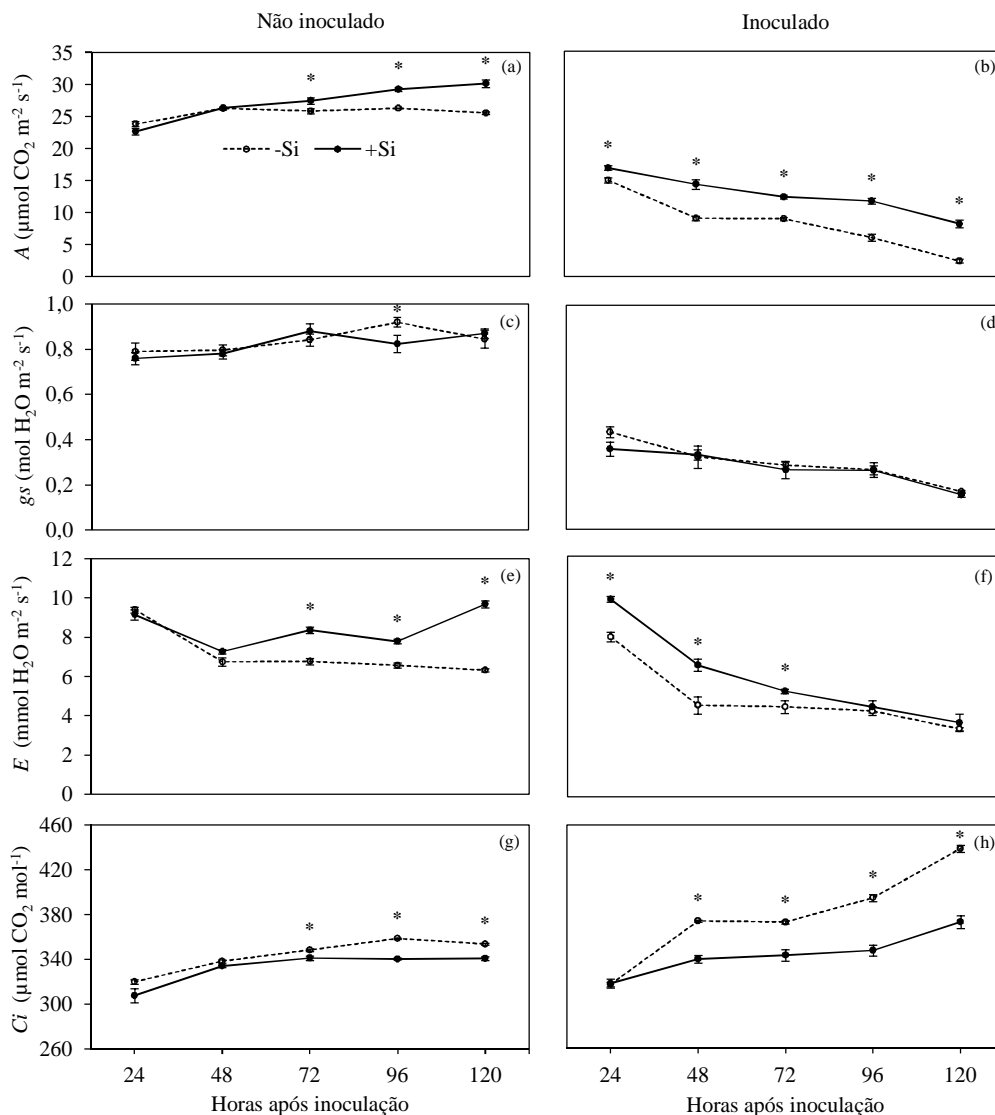


Figura 4. Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e concentração interna de CO_2 (C_i) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L^{-1} de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

(n = 6)

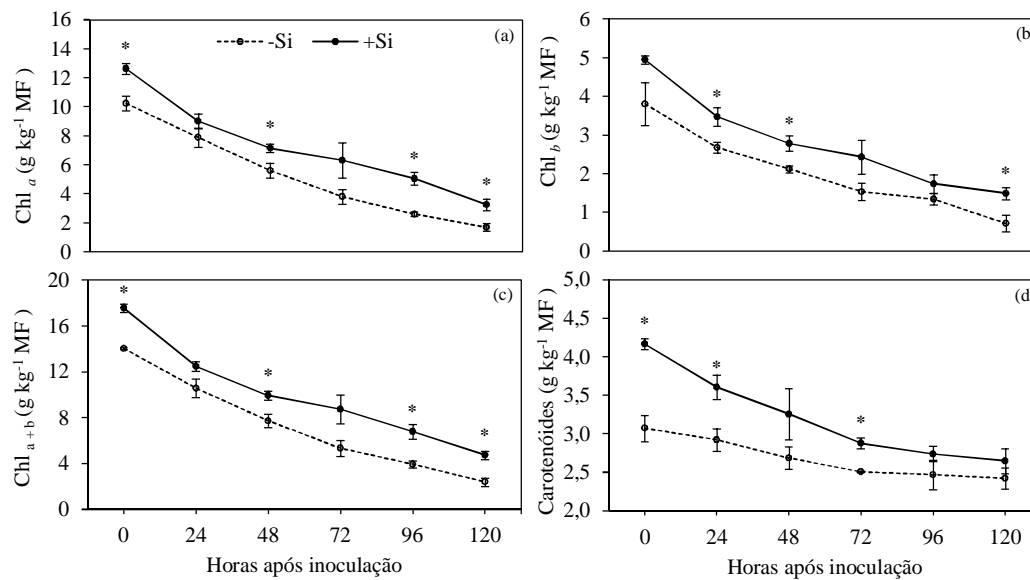


Figura 5. Concentrações de clorofila *a* (Chl *a*) (a), clorofila *b* (Chl *b*) (b), clorofila total (Chl *a* + *b*) (c) e de carotenóides (d) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (0 hai) e inoculadas com *Microdochium oryzae*, crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. MF = matéria fresca.

(n = 6)

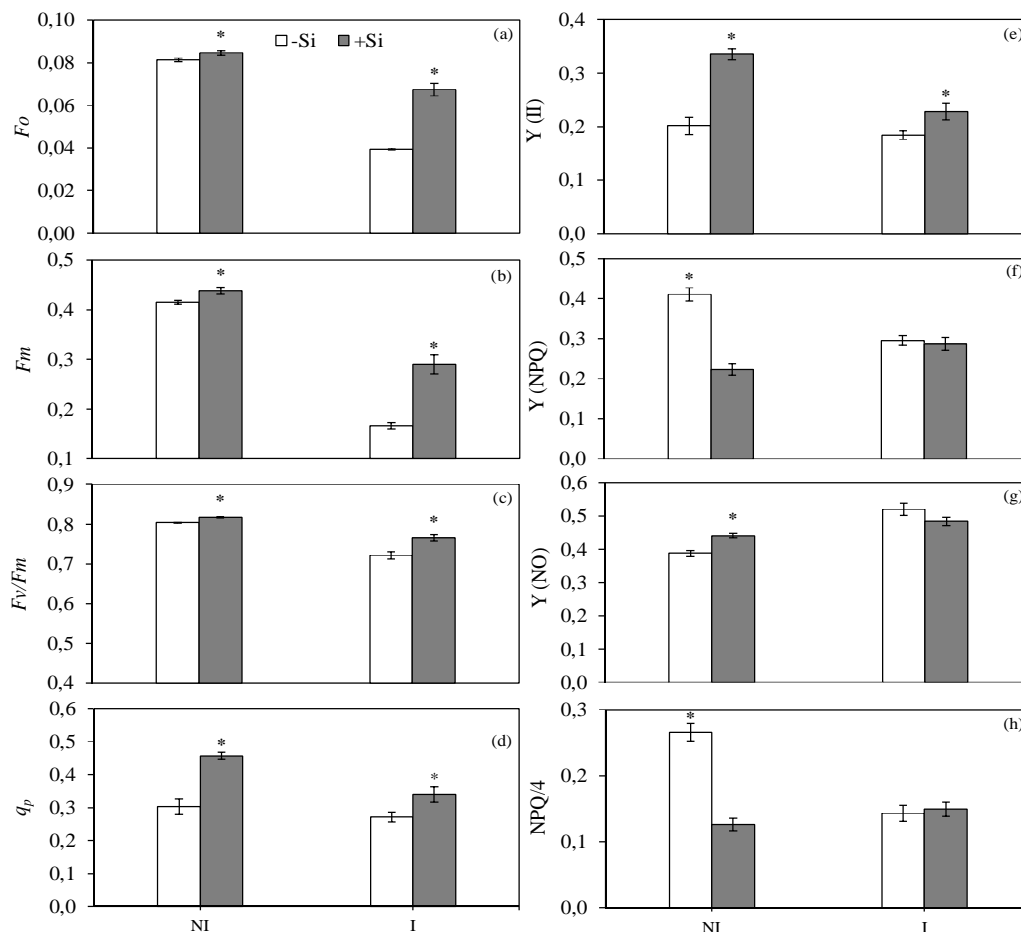


Figura 6. Fluorescência mínima (F_0) (a), fluorescência máxima (F_m) (b), rendimento quântico máximo do FS II (F_v/F_m) (c), coeficiente de extinção da fotoquímica (q_p), rendimento quântico efetivo do FSII $Y(II)$ (e), rendimento quântico da dissipação regulada $Y(NPQ)$ (f), rendimento quântico da dissipação não regulada $Y(NO)$ (g) e dissipação não fotoquímica $NPQ/4$ (h) em folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

(n = 6)

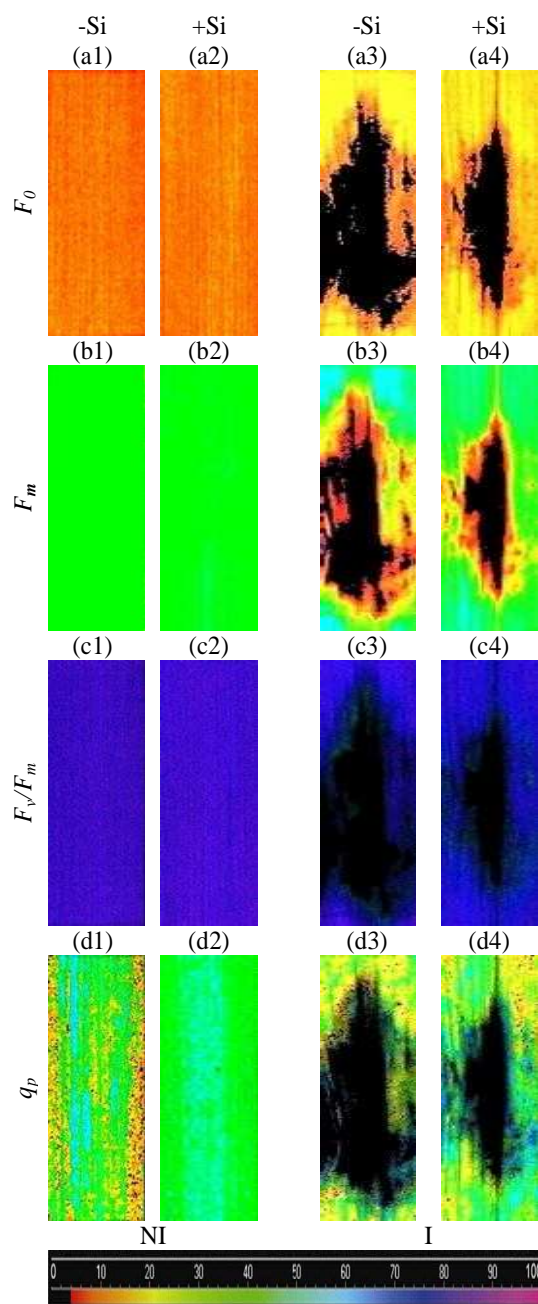


Figura 7. Fluorescência da clorofila *a*: fluorescência mínima (F_0) (a1-a4), fluorescência máxima (F_m) (b1-b4), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m) (c1-c4) e coeficiente de extinção fotoquímica (q_p) (d1-d4) obtidos de folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si.

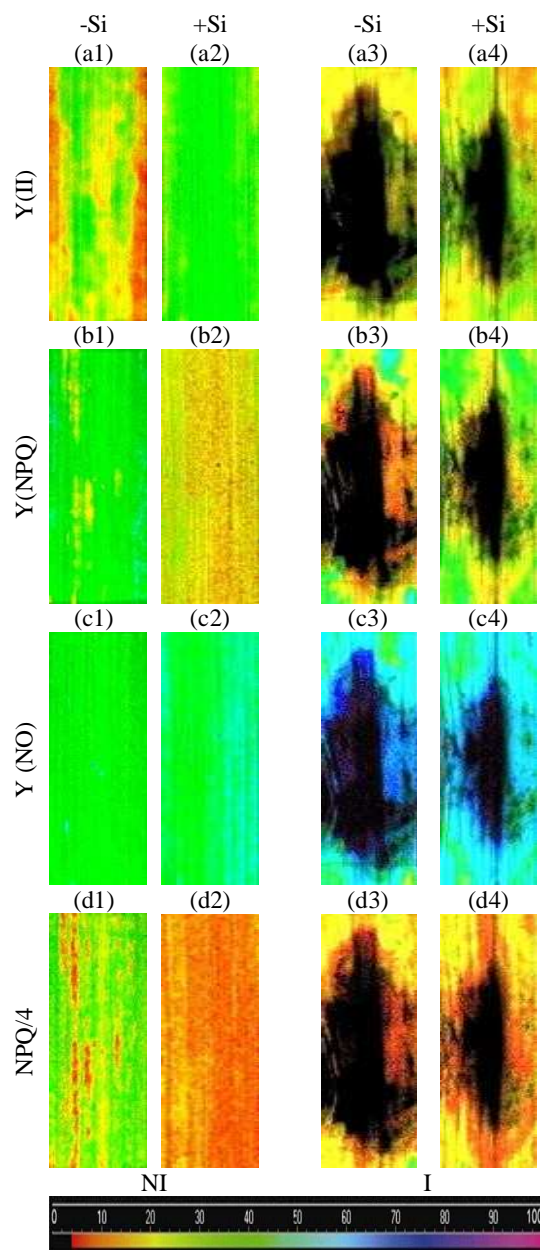


Figura 8. Fluorescência da clorofila *a*: rendimento quântico efetivo do FSII, (YII) (a1-a4), rendimento quântico da dissipação não fotoquímica, (Y(NPQ)) (b1-b4), rendimento quântico da dissipação regulada, Y(NO) (c1-c4) e dissipação não fotoquímica (NPQ/4) (d1-d4) obtidos de folhas de plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si.

Capítulo 4

Aspectos bioquímicos da resistência do arroz à *Microdochium oryzae* potencializado pelo silício

RESUMO

Buscou-se, neste trabalho, investigar o efeito do silício (Si) na resistência de plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*, agente causal da escaudadura. Para esta finalidade, plantas de arroz da cultivar Primavera foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 ou 2 mmol L⁻¹ de Si e inoculadas com *M. oryzae*. A concentração foliar de Si aumentou nas plantas supridas com esse elemento (4,8 dag kg⁻¹) em relação às plantas não supridas (0,9 dag kg⁻¹), o que contribuiu para reduzir a expansão das lesões da escaudadura. A extensão dos danos celulares em resposta a infecção por *M. oryzae* foi reduzida nas plantas supridas com Si, evidenciado pelos menores valores da concentração de aldeído malônico. Maiores concentrações de compostos fenólicos solúveis totais e de derivados de lignina-ácido tioglicólico nos tecidos foliares das plantas supridas com Si contribuíram para a resistência à escaudadura. Maiores atividades das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia liase e lipoxigenase, mas não da quitinase e β -1,3 glucanase, nos tecidos foliares das plantas de arroz supridas com Si foram importantes para a resistência à escaudadura. Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o Si pode aumentar a resistência à escaudadura em plantas de arroz, potencializando mecanismos bioquímicos de defesa em vez de agir apenas como uma barreira física na tentativa de conter a penetração de *M. oryzae*.

INTRODUÇÃO

A escaudadura, causada pelo fungo *Microdochium oryzae* ((Hashiola & Yokogi) Samuels & Hallet = *Rhynchosporium oryzae* Hashiola & Yokogi), é uma das principais doenças do arroz, podendo causar perdas na produção de até 30% (Ou, 1985). A doença causa desuniformidade no estande e diminuição da área fotossinteticamente ativa (Nunes *et al.*, 2004). Além de afetar as folhas, a doença pode acometer o colmo e as panículas, principalmente quando as plantas estão nas fases de perfilhamento e emborrachamento (Prabhu & Filippi, 1997). Os sintomas da escaudadura são lesões de coloração verde-oliva, sem margens bem definidas, nas folhas, as quais ao expandirem formam sucessões de faixas concêntricas, com alternância das cores marrom-clara e escura e, posteriormente, ocorrem coalescência, causando a morte das folhas (Filippi *et al.*, 2005). Períodos de alta pluviosidade e de orvalho prolongado, temperaturas variando de 24 e 28°C, alta densidade de plantas e excesso de adubação nitrogenada são condições favoráveis para ocorrência de epidemias da escaudadura (Ou, 1985; Groth, 1992).

Estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de mecanismos de resistência em plantas contra patógenos potencializados pelo silício (Si) caracterizados sob dois aspectos. O primeiro deles é que a deposição de Si nas paredes das células da epiderme, abaixo da cutícula, forma uma dupla camada com a cutícula, desempenhando um papel importante na prevenção à penetração de fungos (Samuels *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2008; Hayasaka *et al.*, 2008). O outro aspecto é que o Si pode potencializar respostas de defesa no hospedeiro através do aumento da atividade de enzimas de defesa tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia liases, maiores concentrações de compostos fenólicos, lignina e

fitoalexinas, e rápida transcrição de genes associados com a resistência de plantas (Fawe *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2004, 2005; Cai *et al.*, 2008, Brunings *et al.*, 2009, Xavier Filha *et al.*, 2011; Fortunato *et al.*, 2012).

Sabe-se, no entanto, que plantas de arroz supridas com Si têm aumentado sua resistência a diversas doenças fúngicas tais como brusone, mancha-parda e queima das bainhas (Datnoff *et al.*, 2007). Seebold *et al.* (2001) demonstraram que plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *Pyricularia grisea* foram mais resistentes à brusone. Dallagnol *et al.* (2011), estudando a interação arroz-*Bipolaris oryzae*, verificaram que o Si esteve envolvido num mecanismo de defesa mais complexo do que simplesmente a formação de uma barreira física que impediu ou atrasou a penetração do fungo, e que a absorção ativa de Si pelas plantas de arroz foi considerado um fator-chave para a resistência à mancha parda.

Até o momento, nenhuma informação sobre o efeito do Si no controle da escaldadura em arroz foi relatada na literatura. Procurando preencher esta lacuna, o objetivo deste estudo foi de avaliar alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos da possível potencialização da resistência promovida pelo Si.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas

Plantas de arroz da cultivar Primavera foram crescidas em vasos plásticos contendo 5 dm³ de solução nutritiva modificada de Hoagland & Arnon (1950), constituída de: 1,0 mmol L⁻¹ KNO₃; 0,25 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mmol L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,30 µmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 µmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 µmol L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 µmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,1 µmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 µmol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 µmol L⁻¹ EDTA bisódico. O ácido monossilícico, obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (Amberlite IRA 410) (Ma *et al.*, 2002), foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol L⁻¹ de Si.

Inoculação das plantas com *M. oryzae*

O isolado de *M. oryzae* foi cedido gentilmente pela professora Gisele Barata da Silva, da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA. O fungo foi preservado em tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar (BDA), coberto por óleo mineral e mantidos em geladeira a 4°C. Vinte e cinco dias antes da inoculação das plantas, pedaços de meio de cultura BDA contendo estruturas do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Quando a colônia do fungo atingiu 3 cm de diâmetro, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D. por 15 dias (25°C e fotoperíodo de 12 horas). Aos 45 dias após o transplântio, plantas com dez folhas no colmo principal (Matsuo & Hoshikama, 1993) foram inoculadas com *M. oryzae*, utilizando-se discos de meio BDA (0,25 cm²) contendo estruturas do fungo. Três

discos de BDA contendo as estruturas do fungo foram equidistantemente colocados na face adaxial da sétima, oitava e nona folha do colmo principal, da base para o ápice, em cada planta e aderido na superfície da folha com uma leve pressão. As plantas inoculadas permaneceram em câmara de nevoeiro durante cinco dias à temperatura de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

Determinação da concentração foliar de Si

Amostras da sétima, oitava e nona folha do colmo principal das plantas da repetição de cada tratamento foram coletadas às 120 hai, lavadas em água destilada e secadas em estufa com ventilação forçada de ar a 70°C , até atingirem peso constante. Posteriormente, as folhas, sem bainha, foram moídas em moinho tipo Thomas-Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), equipado com peneira de 20 mesh, para determinação da concentração foliar de Si conforme Korndörfer *et al.* (2004).

Avaliação da expansão das lesões

A expansão das lesões da escaldadura foi avaliada na superfície adaxial da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação (hai). Três lesões em uma folha de cada planta por repetição foram medidas (em mm) com auxílio de um paquímetro digital (Worker, USA).

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)

Amostras da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 96 e 120 hai e mantidas em nitrogênio líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas a -80°C até análise. Amostras de folhas foram coletadas de plantas não inoculadas com *M. oryzae* e serviram como controle (0 h). O dano oxidativo nas células das folhas foi estimado como sendo a concentração de ácido 2-tiobarbitúrico total (TBA) reativo e expresso como equivalentes de malondialdeído (MDA) de acordo com Cakmak &

Horst (1991). Um total de 100 mg de tecido foliar foi moído até obtenção de um pó fino usando almofariz e um pistilo com nitrogênio líquido. O pó fino foi homogeneizado em 2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi colocado para reagir com 1,5 mL de solução de TBA (0,5% em ácido tricloroacético a 20%) durante 30 min em banho de água em ebulição a 95°C. Após este período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9.000 g durante 10 min e a absorvância específica foi determinada a 532 nm. A absorvância não específica foi estimada a 600 nm e subtraída do valor da absorção específica. O coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968) foi utilizado para calcular a concentração de MDA, a qual foi expressa em nmol g⁻¹ de matéria fresca (MF).

Determinação das concentrações de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e dos derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLAT)

Amostras da sétima, oitava e nona folha, da base para o ápice, das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 96 e 120 h e mantidas em nitrogênio líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas a -80°C até análise. Amostras de folhas foram coletadas de plantas não inoculadas com *M. oryzae* e serviram como controle (0 h) Amostras de 0,1 g foram maceradas dentro de almofariz com pistilo, ambos de porcelana, com nitrogênio líquido e homogeneizada com 1,5 mL de metanol 80%. O extrato bruto permaneceu por uma noite em mesa agitadora a 300 rpm em temperatura ambiente. Após esse período, o extrato metanólico foi centrifugado por 5 min a 12000 g, sendo o sobrenadante usado para determinação da concentração de CFST. O pellet foi armazenado a -80°C para quantificação da lignina. O método desenvolvido por Zieslin & Ben-Zaken (1993)

foi usado para determinação da concentração de CFST, com algumas modificações. Um volume de 150 μL do reagente Fenol Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, São Paulo, SP) (0,25 N) foi adicionado a 150 μL do extrato metanólico, misturado e mantido em temperatura ambiente por 5 min. Logo após, 150 μL de carbonato de sódio (1 M) foi adicionado à mistura, seguido de agitação e mantido em temperatura ambiente por 10 min. A essa mistura adicionou-se 1,0 mL de água destilada. Após 30 min, foi realizada a leitura da solução de coloração azul a 725 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de CFST foi expressa em μg de CFST (expressos em termos de catecol) kg^{-1} de MF. Durante todo o processo, os microtubos de centrifugação foram protegidos com papel alumínio para minimizar a oxidação dos compostos fenólicos.

O volume de 1,5 mL de água estéril destilada foi adicionado ao resíduo obtido após a extração dos CFST. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 5 min, sendo descartado o sobrenadante. Essa etapa foi repetida três vezes. Em seguida, o resíduo foi seco a 65°C por, aproximadamente, 12 h. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi usado para determinação da concentração dos DLATG de acordo com o método de Barber & Ride (1988). Um volume de 1,5 mL da solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) e HCl 2 N (1:10) foi adicionado ao resíduo seco seguido de incubação em banho-maria a 100°C, por 4 h. Após esse período, os microtubos de centrifugação foram colocados no gelo por 10 min. Logo após, a solução foi centrifugada a 12.000 g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada estéril e centrifugado a 10.000 g por 10 min, sendo descartado o sobrenadante, enquanto o pellet foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 N. Após agitação por 12 h em mesa

agitadora a 150 rpm, à temperatura ambiente, foi realizada centrifugação a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de centrifugação. Nesse, foram adicionados 200 µL de HCL concentrado e a solução mantida a 4°C por 4 h. A precipitação dos DLATG foi obtida após centrifugação a 10.000 g por 10 min, descartando-se o sobrenadante e o pellet dissolvido em 2 mL de NaOH 0,5 N. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 290 nm. A concentração dos DLATG foi expressa em mg de DLATG kg⁻¹ MF, utilizando-se uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxiopropil (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP).

Determinação da atividade de enzimas de defesa

Amostras da sétima, oitava e nona folhas, da base para o ápice, das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas às 24, 48, 72, 96 e 120 hai e mantidas em nitrogênio líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas a -80°C até a determinação da atividade das enzimas polifenoloxidasas (PFO), peroxidases (POX), quitinases (QUI), β-1,3-glucanases (GLU), fenilalanina amônia-liases (FAL) e lipoxigenases (LOX). Amostras de folhas foram coletadas de plantas não inoculadas com *M. oryzae* e serviram como controle (0 h).

Para obter o extrato vegetal utilizado para determinar as atividades da PFO e POX, 0,3 g de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em almofariz com a adição de polivinilpirrolidona (PVP) a 2% (p/v) para se obter um pó fino. O pó foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e 0,1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min à 4°C e os sobrenadantes foram usados para as determinações enzimáticas. A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com o

método de Kar & Miashra (1976). Uma mistura de 950 μL de água destilada, 750 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 600 μL de pirogalol 100 mM e 600 μL de peróxido de hidrogênio 100 mM foram adicionados a 100 μL de extrato. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm a cada 10 s durante 1 min, após a adição do extrato à mistura, totalizando seis leituras. O coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da POX (Chance & Maehley, 1955), a qual foi expressa em μmol de purpurogalina produzido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Durante todo o processo, os microtubos de centrifugação foram cobertos com folha de alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz. A atividade da PFO foi determinada de forma semelhante a POX, excluindo o peróxido de hidrogênio da mistura.

Para obter o extrato vegetal utilizado para determinar as atividades da QUI e GLU, 0,3 g de tecido foliar foram macerados com nitrogênio líquido num almofariz com a adição de PVP (2%) para se obter um pó fino. O pó foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de PMSF. O material homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g durante 25 min a 4°C e o sobrenadante foi usado como o extrato da enzima. A atividade da QUI foi determinada pelo método de Robert & Selitrennikoff (1988) modificado por Harman *et al.* (1993). A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 μL do sobrenadante a uma mistura composta de 480 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 20 μL do substrato *p*-nitrofenil- β -D-N-N'-diacetilquitobiose (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) na concentração de 2 $\text{mg}^{-1} \text{mL}^{-1}$. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 h. A reação foi interrompida com adição de 500 μL de carbonato de sódio a 0,2 M. Nas amostras controle, apenas o carbonato de sódio foi adicionado depois da adição do extrato à mistura de reação e as amostras

foram incubadas em banho-maria a 37°C por 2 h. A absorvância do produto final liberado pela QUI foi determinada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de $7 \times 10^4 \text{ mM cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da QUI, a qual foi expressa em mol de *p*-nitrofenil produzido por $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972) com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 μL do sobrenadante a uma mistura composta de 230 μL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 μL do substrato laminarina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) na concentração de $4 \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 45°C por 30 min. Após o período de incubação, determinou-se a quantidade de açúcares redutores através da adição de 250 μL do ácido dinitrosalicílico a mistura, em seguida, da sua incubação em banho-maria por 15 min a 100°C. A reação foi interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30°C. Nas amostras controle, a mistura de reação foi à mesma, exceto que o extrato vegetal foi adicionado após o aquecimento da mistura a 100°C. A absorvância do produto liberado pela GLU foi medida a 540 nm e sua atividade foi expressa em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Para a obtenção do extrato utilizado na determinação da atividade da fenilalanina amônia-liases (FAL), 0,3 g de tecido foliar foi macerado com nitrogênio líquido num almofariz com a adição de PVP (2%) para se obter um pó fino. O pó foi homogeneizado em 2 mL de 0,05 M de borato de sódio (pH 8,3) contendo 5 mM β -mercaptoetanol e 1 mM de EDTA. A mistura foi centrifugada duas vezes a 7.000 g durante 15 min. O sobrenadante foi utilizado como substrato para determinar a atividade da FAL. A reação foi iniciada após a adição de 0,5 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 1 mL 100 mM de L-

fenilalanina. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30°C durante 4 h. Nas amostras controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão Tris- HCl. A reação foi finalizada pela adição de 60 µL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zucker, 1965) foi usado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Para a obtenção do extrato utilizado na determinação da atividade da LOX, 0,2 g de tecido foliar foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) contendo Triton-X 1% (v/v) e 1% de PVP. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi usado como extrato para determinação da atividade da LOX. A reação foi iniciada após adição de 5 µL do extrato à uma mistura contendo 780 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e 15 µL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A atividade da LOX foi determinada conforme metodologia descrita por Axelrod *et al.* (1981). A absorbância do produto liberado pela LOX foi medida em espectrofotômetro a 234 nm. O coeficiente de extinção molar de $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para determinar a atividade da LOX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial 2×2 com seis repetições. Os fatores estudados foram: plantas não supridas (-Si) ou supridas com Si (+Si) e não inoculadas ou inoculadas com *M. oryzae*. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso contendo cinco

plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t ($P \leq 0.05$) utilizando-se o software SAS versão 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Concentração foliar de Si

A concentração foliar de Si aumentou significativamente nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com Si, tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas com *M. oryzae* (Fig.1).

Avaliação da expansão das lesões

A expansão das lesões da escaudadura foi significativamente menor em 21% às 72 hai, de 15% às 96 hai e de 18% às 120 hai nas plantas supridas com Si em comparação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 2).

Concentração de MDA

Nas plantas supridas com Si os valores da concentração de aldeído malônico foram significativamente menores em relação às plantas não supridas com esse elemento na ordem de 31, 23, 17, 14 e 26%, respectivamente, às 24, 48, 72, 96 e 120 hai (Fig. 3a).

Concentração de CFST

Nas plantas não supridas com Si houve aumentos significativos na concentração de CFST às 0, 24 e 48 hai, em relação às plantas supridas com esse elemento. As 96 e 120 hai, aumentos significativos de 31 e 71%, respectivamente, ocorreram para as plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 3b).

Concentração dos DLATG

Nas plantas supridas com Si o valor da concentração de DLATG foi significativamente menor às 24 hai e aumentou significativamente em 3% às 120 hai, em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig 3c).

Atividade das enzimas de defesa

Aumentos significativos de 28% às 0 hai, de 28% às 72 hai, de 30% às 96 hai e de 42% às 120 hai nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento foram encontradas para a atividade da PFO (Fig. 4a). Para a atividade da POX, aumentos de 37% às 0 hai, de 31% às 72 hai, de 36% às 96 hai e de 24% às 120 hai foram encontrados nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4b).

As atividades da QUI e da GLU foram significativamente maiores para as plantas não supridas com Si em relação às plantas supridas com esse elemento (Fig. 4c e 4d). Aumentos significativos na atividade da QUI de 18% às 96 hai e de 16% às 120 hai foram encontradas nas plantas não supridas em relação às plantas supridas com esse elemento. A atividade da GLU aumentou significativamente em 33, 48, 38 e 34%, respectivamente, às 24, 72, 96 e 120 hai nas plantas não supridas com Si em comparação com as plantas supridas com esse elemento.

A atividade da FAL foi significativamente maior nas plantas supridas com Si em 42, 46 e 52%, respectivamente, às 72, 96 e 120 hai em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4e). Aumentos significativos na atividade da LOX de 31% às 48 hai, de 14% às 72 hai e de 28% às 120 hai ocorreram nas plantas supridas com Si em relação às plantas não supridas com esse elemento (Fig. 4f).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo reforçam os relatos de que o Si pode diminuir a intensidade de várias doenças em culturas de importância econômica tais como arroz, cevada, milho, pepino, aveia, centeio, soja, sorgo, morango, trigo, feijoeiro e bananeira (Bélanger *et al.*, 2003; Datnoff *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009; Dallagnol *et al.*, 2011; Xavier Filha *et al.*, 2011, Polanco *et al.*, 2012; Fortunato *et al.*, 2012). Ademais também fornecem as primeiras evidências de respostas bioquímicas de defesa potencializadas pelo Si em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*.

A concentração de Si no tecido foliar das plantas de arroz supridas com esse elemento contribuiu para reduzir os sintomas da escaldadura, registrando valores de 4,8 dag kg⁻¹, valor este similar ao que têm sido encontrado em plantas acumuladoras de Si (arroz, cana-de-açúcar e outros cereais), podendo acumular até 5 dag kg⁻¹ de Si em peso seco da parte aérea (Rodrigues *et al.*, 2001; Datnoff *et al.*, 2007, Dallagnol *et al.*, 2011).

Sabe-se que plantas de arroz supridas com Si são mais resistentes a patógenos fúngicos (Rodrigues *et al.*, 2004, 2005). Dallagnol *et al.* (2009), avaliando alguns componentes de resistência do arroz de plantas do mutante *lsi 1* (deficiente na absorção ativa de Si) e do tipo selvagem (cultivar Oochikara) à mancha parda, demonstraram que o período de incubação em plantas de arroz do tipo selvagem foi aumentado em 6 h pelo suprimento de Si e que a área abaixo da curva do progresso da doença, o tamanho final da lesão e a taxa de expansão da lesão foram reduzidos em 65, 75 e 33%, respectivamente. Os autores concluíram que a concentração reduzida de Si no tecido foliar das plantas do mutante *lsi 1* foi afetada, diminuindo a

resistência à mancha parda e sugeriram que uma concentração mínima de Si é necessária para que a resistência ocorra. No presente estudo, é plausível sugerir que a redução da expansão das lesões nas plantas supridas com Si possa ter ocorrido pela maior deposição de Si nos tecidos foliares.

A extensão dos danos celulares em resposta à infecção por patógenos pode ser estimada pela concentração de MDA, a qual se refere aos produtos da peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática (Mandal *et al.*, 2008). É bem conhecido que a peroxidação de lipídeos na membrana plasmática causada por espécies reativas de oxigênio ocorre devido a estresses originados nas células (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Fu & Huang, 2001), tais como danos causado por toxinas inespecíficas produzidas por *M. oryzae*. No entanto, sabe-se que o Si tem efeitos positivos sobre a proteção celular, especialmente em plantas sob estresse salino (Datnoff *et al.*, 2007). Liang *et al.* (2005) demonstraram que o Si teve efeito sobre a atividade da enzima H⁺ATPase em plantas submetidas a estresse salino, sugerindo que, de algum modo, esse elemento afete a estrutura e a integridade da membrana plasmática (Liang *et al.*, 2005). Com efeito, o Si também aumentou a estabilidade dos lipídeos na membrana plasmática em plantas de arroz submetidas à salinidade e temperaturas elevadas (Agarie *et al.*, 1998). Dallagnol *et al.* (2011) verificaram que em plantas de arroz supridas com Si e infectadas por *Bipolaris oryzae* houve redução na peroxidação lipídica, diminuindo, assim, a concentração de MDA e consequentemente, ocasionando menores danos aos tecidos foliares. No presente estudo, a redução na expansão das lesões está associada com uma menor concentração de MDA. Nas plantas não supridas com Si, elevados níveis da peroxidação lipídica indicam aumento na concentração de MDA, evidenciando que

houve aumento na permeabilidade da membrana nas folhas das plantas de arroz em função do maior tamanho das lesões.

Maiores concentrações de CFST e de DLATG nas plantas de arroz supridas com Si foram importantes para a resistência à escaldadura. Além disso, pode ser postulado que alterações na diversidade e na concentração de compostos fenólicos pós-infecção, possivelmente modulados por Si, contribuíram para a resistência das plantas de arroz à infecção por *M. oryzae*. Alguns estudos relatam que o suprimento de Si pode afetar a produção de compostos fenólicos em plantas infectadas por patógenos (Carver *et al.*, 1998, Rodrigues *et al.*, 2005; Dallagnol *et al.*, 2011; Fortunato *et al.*, 2012). Compostos fenólicos e precursores de lignina demonstram ser tóxicos a patógenos como *Puccinia reconditae* f. sp. *tritici* em trigo e *Pyricularia grisea* em arroz (Rodrigues *et al.*, 2003; Southerton & Deverall, 1990) devido a sua interação com lipídios e fosfolipídios presentes nas paredes das células fúngicas (Weete, 1980). A lignina é ligada covalentemente a hemiceluloses e a polissacarídeos, conferindo resistência mecânica à parede celular do hospedeiro, que, por sua vez, afeta a difusão de enzimas líticas e toxinas não específicas produzidas pelo patógeno durante a colonização dos tecidos (Chabannes *et al.*, 2001). Dallagnol *et al.* (2011) demonstraram que a concentração de DLATG em plantas de arroz supridas com Si esteve associada com o aumento da resistência à mancha parda. Polanco *et al.* (2012) relataram que a concentração de CFST não foi importante para a resistência de plantas de feijoeiro à infecção por *Colletotrichum lindemuthianum*, ao contrário da concentração de DLATG. Os autores postularam que a redução na concentração de CFST esteve relacionada com o aumento na produção de precursores de lignina, determinado como DLATG, sendo os produtos finais da via

dos fenilpropanóides, o que os tornam mais importantes para a resistência do feijoeiro à infecção por *C. lindemuthianum*.

A polimerização de compostos fenólicos que contribui para o aumento da lignificação do tecido foliar envolve a participação das enzimas PFO e POX (Grisebach, 1981). A POX desempenha um papel importante na resposta de defesa do hospedeiro através da produção de H₂O₂, a fim de impedir o crescimento de fitopatógenos e contribui para a lignificação da parede celular ou para o aumento de ligações cruzadas com proteínas presentes na parede celular (Chittoor *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2006). Aumentos na atividade da POX durante interações patógeno-hospedeiro estão intimamente associados com uma incorporação progressiva de compostos fenólicos na parede celular (Fink *et al.*, 1991). No entanto, no presente estudo, os aumentos nas atividades da POX e da PFO foram responsivos ao suprimento de Si às plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*. Coincidentemente, Dallagnol *et al.* (2011) encontraram aumentos na atividade da POX em plantas de arroz supridas com Si e inoculadas com *Bipolaris oryzae*. Rodrigues *et al.* (2005) relataram aumento no número de transcritos do gene *pox* em plantas de arroz durante a infecção por *Pyricularia grisea*, o que resultou em aumento na concentração de DLATG. As atividades da POX e da PFO aumentaram em raízes de bananeira supridas com Si e infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Fortunato *et al.*, 2012). De acordo com Soares *et al.* (2004), a atividade da PFO aumentou em resposta à infecção por *Curtobacterium flaccumfaciens*, e um de seus principais papéis parece ser o de promover proteção às células das folhas de feijoeiro, aumentando a resistência à doença, provavelmente por oxidar compostos fenólicos em quinonas, as quais são muito mais tóxicas aos patógenos.

A QUI e a GLU catalisam a hidrólise de carboidratos de quitina e de β -1,3-glucana, respectivamente, degradando parcialmente a parede celular de vários fungos com a liberação de oligossacarídeos e, assim, promovendo respostas de defesa do hospedeiro (Keen & Yoshikawa, 1983, Boller *et al.*, 1983). Estas enzimas inibem o crescimento da maioria dos fungos fitopatogênicos (Mauch *et al.*, 1988). As atividades da QUI e da GLU foram maiores nas folhas das plantas não supridas com Si e não tiveram participação efetiva na resistência contra a escaldadura. Em contraste com os resultados obtidos no presente estudo, Dallagnol *et al.* (2011) encontraram aumento na atividade da QUI em plantas de arroz supridas com Si e inoculadas com *Bipolaris oryzae* em relação às plantas não inoculadas. Xavier Filha *et al.* (2011) também verificaram maior atividade da QUI em plantas de trigo supridas com Si e infectadas por *Pyricularia grisea*, confirmando a importância do Si na maior atividade dessa enzima na resistência a brusone

A atividade da FAL foi maior nas plantas supridas com Si indicando a importância da rota dos fenilpropanóides na resistência do arroz à infecção por *M. oryzae*, especialmente quando considerando as alterações na concentração de CFST pós-infecção, possivelmente modulada por Si, resultando, conseqüentemente, na maior concentração de DLATG.

A atividade da LOX foi maior nos tecidos foliares das plantas supridas com Si, contribuindo para a resistência à escaldadura. A síntese de alguns compostos com funções de sinalização e de atividade antimicrobiana envolvidos na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos têm sido relacionada com a atividade da LOX (Creelman & Mullet, 1997). De acordo com Croft *et al.* (1993), um composto derivado de LOX mostrou atividade anti-microbiana contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em plantas de feijoeiro devido a maior expressão do gene *lox*.

Polanco *et al.* (2012) encontraram aumento na atividade da LOX em plantas de feijoeiro supridas com Si e infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* em relação às plantas não supridas com esse elemento, evidenciando o efeito do Si na maior atividade desta enzima e na resistência a antracnose.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam os resultados de outros estudos descritos na literatura sobre o efeito do fornecimento de Si em aumentar a resistência do arroz a patógenos foliares. Para a interação o arroz-*M. oryzae*, o Si mostrou ser importante em restringir a expansão das lesões, ao mesmo tempo em que, propiciou aumentos nas concentrações de compostos fenólicos e lignina, além de promover uma maior atividade de POX, PFO, FAL e LOX em um cenário onde a destruição de tecidos foliares por *M. oryzae* foi mínima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarie S, Hanaoka N, Ueno O, Miyazaki A, Kubota F, Agata W, Kaufman P B, 1998. Effects of silicon on tolerance to water deficit and heat stress in rice plants (*Oryza sativa* L.) monitored by electrolyte leakage. *Plant Production Science* 1, 96-103.

Arnon DI, Stout PR, 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology* 14, 371-375.

Axelrod B, Cheesbrough TM, Laasko S, 1981. Lipoxygenases from soybeans. *Methods in Enzymology* 71, 441-51.

Barber MS, Ride JP, 1988. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 185-197.

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

Boller T, 1991. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo AK, Suttle JC (eds) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton, CRC Press, p. 293-314.

Bradford MN, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst K, 2009. Differential gene expression of rice in responses to silicon and the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology* 155, 161-170.

- Cai KZ, Gao D, Luo SM, Zeng RS, Yang JY, Zhu XY, 2008. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. *Plant Physiology* 134, 324-333.
- Cakmak L, Host W J, 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology* 83, 463-468.
- Carver TLW, Robbins MP, Thomas BJ, Troth K, Raistrick N, Zeyen RJ, 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.
- Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, 2001. *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant Journal* 28, 271-282.
- Chance B, Maehley AC, 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2, 764-775.
- Chittoor JM, Leach JE, White FF, 1999. Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, p.171-193. Eds Datta, SK & Muthukrishnan S, Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Creelman RA, Mullet JE, 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 355-381.
- Croft KPC, Juntter F, Slusarenko AJ, 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiology* 101, 13-24.

- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE, 2009. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* 99, 116-121.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC, 2011. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* 101, 92-104.
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW, 2007. Silicon and plant disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*, p. 233-246. Eds. Datnoff LE, Elmer WH, DM. Paul Huber DM, MN, USA: APS Press.
- Fawe A, Abou-Zaid M, Menzies JG, Bélanger RR, 1998. Silicon mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* 88, 396-401.
- Filippi MC, Prabhu AS, Silva GB, 2005. *Escaldadura do arroz e seu controle*. Circular Técnica. Goiânia: Embrapa CNPAF.
- Fink W, Deising H, Mendgen K, 1991. Early defense responses of cowpea (*Vigna sinensis* L.) induced by non-pathogenic rust fungi. *Planta* 185, 246-254.
- Fortunato AA, Rodrigues FA, Nascimento KJT, 2012. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to Fusarium Wilt potentiated by silicon. *Phytopathology* 102, 957-966.
- Fu J, Huang B, 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45, 105-114.
- Groth D, 1992. Leaf scald. In: Webster R, Gunnell P (Ed). *Compendium of rice diseases*. St. Paul: American Phytopathological Society.
- Grisebach H, 1981. Lignin. In: *The Biochemistry of Plants*, p. 451-478 Ed. Conn EE. New York: Academic Press.

- Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Di Pietro A, Peterbauer C, Tronsmo A, 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83, 313-318.
- Hayasaka T, Fujii H, Ishiguro K, 2008. The role of silicon in preventing appressorial penetration by the rice blast fungus. *Phytopathology* 98, 1038-1044.
- Heathe RL, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 189-198.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plant without soil. *Calif. Agricultural Experiment. Station* 347, 1-32.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P, Arrese-Igor C, Becana M, 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116,173-181.
- Kar M, Mishra D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
- Keen NT, Yoshikawa M, 1983. B-1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiology*, 71, 460-465.
- 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, Nolla A, 2004. *Análise de Silício: Solo, Planta e Fertilizante*. Uberlândia, Brasil: Universidade Federal de Uberlândia, Boletim Técnico.
- Lever, 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47, 273-279.

- Liang Y, Zhang W, Chenc Q, Ding R, 2005. Effects of silicon on H⁺ATPase and H⁺PPase activity, fatty acid composition and fluidity of tonoplast vesicles from roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 53, 29-37.
- Mandal KM, Pandey D, Purwar S, Singh US, Kumar A, 2006. Influence of jasmonic acid as potential activator of induced resistance against karnal bunt in developing spikes of wheat. *Journal Bioscience* 31, 607-616.
- Marschner H, 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic, 889 p.
- Matsuo T, Hoshikama K, 1993. *Science of the Rice Plant Morphology*. Tokyo, Japan: Food and Agriculture Policy Research Center.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T, 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1, 3-glucanase. *Plant Physiology* 88, 936-942.
- Nunes CDM, Ribeiro AS, Terres ALS, 2004. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. In: Gomes AS, Magalhães Jr. AM, Eds. *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 579-622.
- Ou SH, 1985. *Rice Diseases*. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Shulman P, Silva LC, Neves FW, Vale FXR, 2012. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology* 161, 140-150.
- Prabhu AS, Filippi MC, 1997. Arroz (*Oryza sativa*) no controle de doenças. In: Vale FXR, Zambolim L, Eds. *Controle de doenças de plantas*. Viçosa MG. Ministério da Agricultura e Abastecimento 1, 51-81.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP, 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134, 169-176.

- Rodrigues FA, Korndörfer GH, Corrêa GF, Buki GB, Silva OA, Datnoff LE, 2001. Response of six gramineae species to application of calcium meta silicate. In *Silicon in Agriculture. Studies in Plant Science*. Volume 8, p. 378. Eds Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B. V.
- Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Bélanger RR, 2003. Ultra structural and cytochemical aspects of silicon mediated rice blast resistance. *Phytopathology* 93, 535-546.
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR, 2004. Silicon enhances accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94, 177-183.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA, 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 144-59.
- Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndorfer GH, 2009. Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australasian Plant Pathology* 38, 366-372.
- Samuels AI, Glass ADM, Ehret DL, Menzies JG, 1991. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant Cell Environment* 14, 485-492.
- 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.

Soares RM, Maringoni AC, Lima GPP, 2004. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. *Fitopatologia Brasileira* 29, 373-377.

Southerton SG, Deverall BJ, 1990. Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36, 483-494.

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL, 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141, 373-378.

Weete ER, 1980. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum Press, New York.

Xavier Filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR, 2011. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* 40, 38-38.

Zieslin N, Ben-Zaken R, 1993. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry* 31, 333-339.

Zucker M, 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40, 779-78.

FIGURAS

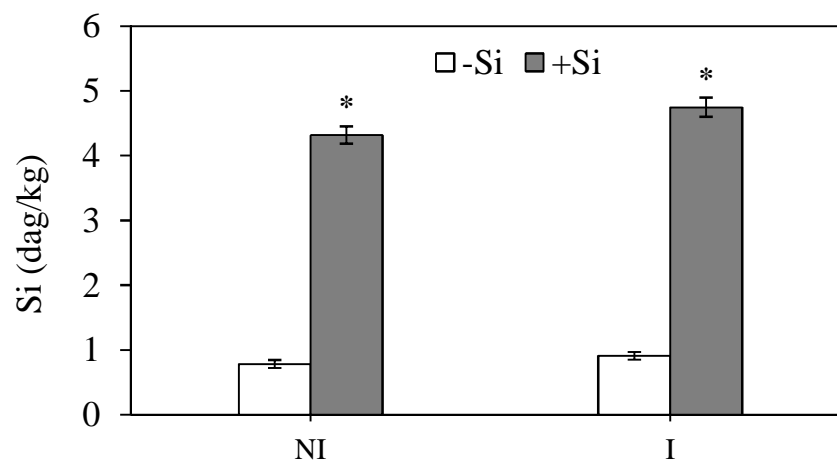


Figura 1. Concentração foliar de silício (Si) em plantas de arroz não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Microdochium oryzae* e crescidas em solução nutritiva contendo 0 (-Si) ou 2 (+Si) mmol L⁻¹ de Si. Médias dos tratamentos -Si e +Si seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Erro padrão da média está representado em cada barra.

(n = 6)

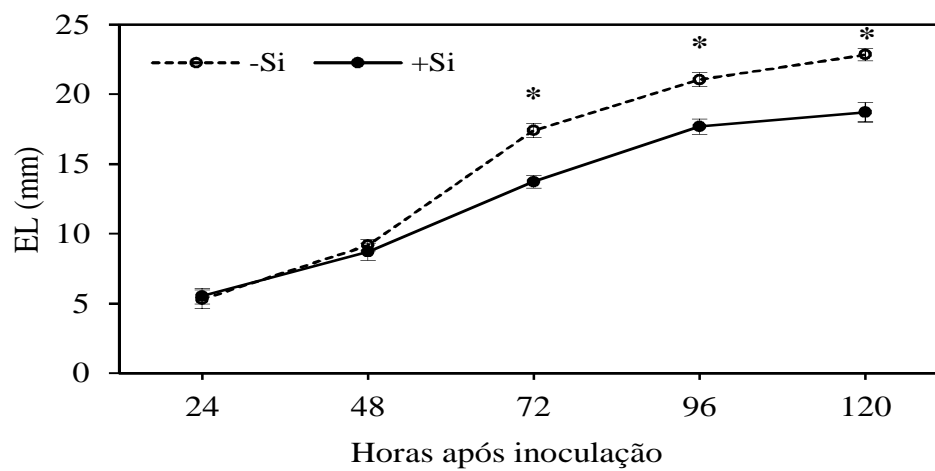


Figura 2. Expansão de lesões (EL) da escaldadura em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

(n = 6)

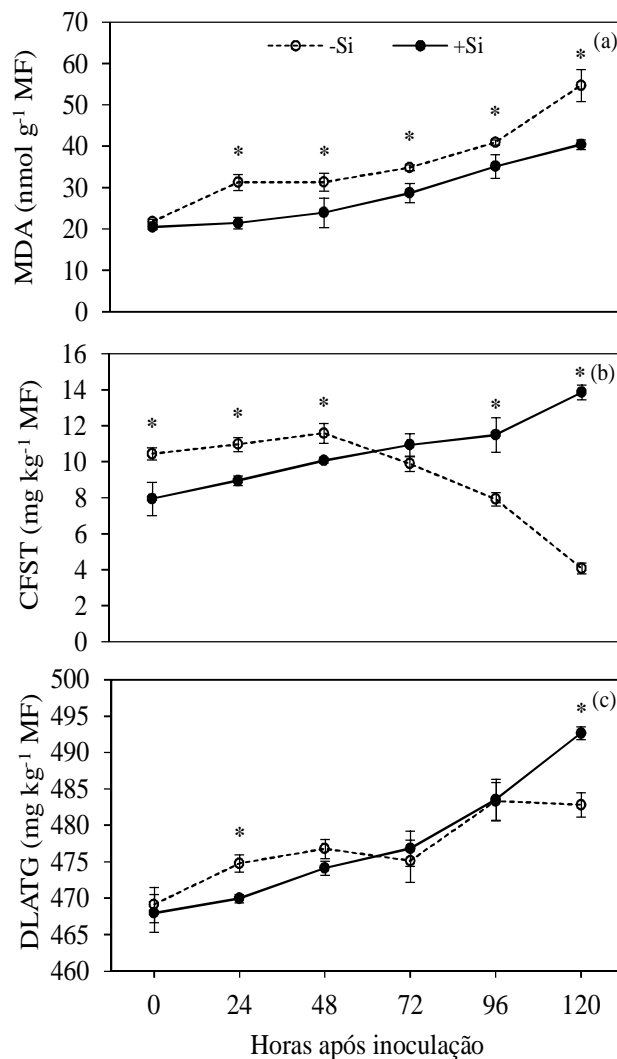


Figura 3. Concentração de aldeído malônico (MDA) (a), compostos fenólicos solúveis totais (CFST) (b) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG) (c) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. MF = matéria fresca.

(n = 6)

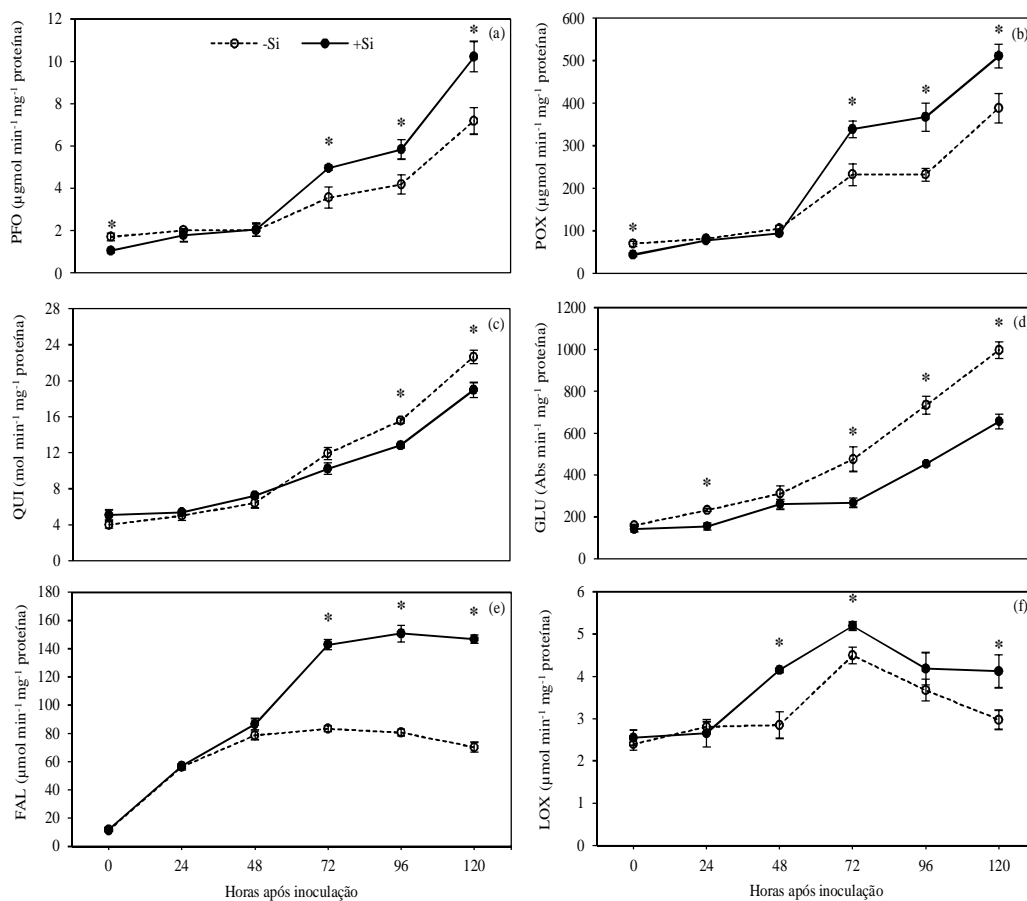


Figura 4. Atividades de polifenoloxidasas (PFO) (a), peroxidases (POX) (b), quitinases (QUI) (c), β -1,3-glucanases (GLU) (d), fenilalanina amônia-liases (FAL) (e) e lipoxigenases (LOX) (f) em folhas de plantas de arroz supridas (+Si) ou não supridas (-Si) com silício (Si) e inoculadas com *Microdochium oryzae*. Médias dos tratamentos -Si e +Si para cada época de avaliação seguidas de asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

(n = 6)

CONCLUSÕES GERAIS

1) A fluorescência de imagem da clorofila *a* mostrou-se uma importante ferramenta a ser utilizada em estudos de desempenho fotossintético em plantas infectadas por patógenos. A utilização da energia para os processos fotossintéticos e a capacidade de dissipação do excesso de energia na maquinaria fotossintética foi comprometida durante a infecção por *Microdochium oryzae*, reduzindo o rendimento fotoquímico e induzindo a inibição do aparato fotossintético nas áreas lesionadas, evidenciando que a infecção tinha efeito local sobre a fotossíntese. Reduções na fotossíntese durante a infecção por *M. oryzae* esteve associada a reduções na concentração de pigmentos, o que limitou a absorção da radiação fotossinteticamente ativa.

2) O sistema antioxidativo das plantas infectadas por *M. oryzae* funcionou a taxas aumentadas na tentativa de impedir a acumulação de espécies reativas de oxigênio que por ventura acabou por não remover, com eficiência, o excesso de H₂O₂ resultando em danos oxidativos.

3) Na presença de Si, a atividade fotossintética e a eficiência de utilização da energia luminosa e sua conversão em energia química foram potencializados, independente da inoculação com *M. oryzae*, evidenciando que o Si é um elemento importante na melhora do rendimento fotossintético em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*.

4) A potencialização da defesa das plantas de arroz contra a escaldadura pelo Si esteve associada com aumentos nas concentrações de compostos fenólicos e derivados de lignina-ácido tioglicólico, além de uma maior atividade das enzimas

peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia liases e lipoxigenases em um cenário onde a destruição de tecidos foliares por *M. oryzae* foi mínima.