



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
CURSO DE AGRONOMIA

**NOÇÕES SOBRE INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO E INDUÇÃO DE  
RESISTÊNCIA EM PLANTAS**

GABRIELA ALVES DA COSTA

GARANHUNS – PERNAMBUCO

2019

GABRIELA ALVES DA COSTA

**NOÇÕES SOBRE INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO E INDUÇÃO DE  
RESISTÊNCIA EM PLANTAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, como parte das exigências do Curso de Graduação em Agronomia para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Ueder Pedro Lopes

GARANHUNS – PERNAMBUCO

2019

GABRIELA ALVES DA COSTA

**NOÇÕES SOBRE INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO E INDUÇÃO DE  
RESISTÊNCIA EM PLANTAS**

Aprovada em 29/01/2019:

---

Rejane do Livramento Freitas Lopes  
(Doutora)

---

Rayanne Ferreira de Moraes  
(Mestre)

---

Prof. (a) Ueder Pedro Lopes  
(Doutor - UFRPE)

## **IDENTIFICAÇÃO**

Nome do Aluno: Gabriela Alves da Costa

Curso: Agronomia

Matrícula: 70508206448

Tipo do Estágio: Supervisionado Obrigatório

Área de conhecimento: Fitossanidade

Empresa/Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Setor: Departamento de Fitopatologia – Laboratório de Interação  
Planta-Patógeno

Supervisor: Fabrício Ávila Rodrigues

Função: Professor associado

Orientador: Prof. Dr. Ueder Pedro Lopes

Período de Realização: 18/10/2018 a 17/12/2018

Total de Horas: 380 h

## **Dedicatória**

*Ao meu pai.*

*À Minha mãe (in memoriam).*

*Aos meus irmãos Antonio Carlos e Carlos Antonio.*

*Às minhas avós Isaura e Maria de Lourdes.*

*Aos meus parentes e amigos.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela minha família e por todas as bênçãos que recebo todos os dias.

Ao meu pai Jorge Alves, à minha mãe Rosineide Ferreira (in memoriam) e meus irmãos Antonio Carlos e Carlos Antonio Alves, por estarem sempre presentes me apoiando, aconselhando e me impulsionando em busca dos meus objetivos, mesmo diante das dificuldades e adversidades.

Aos meus familiares e, em especial às minhas avós Isaura Correia e Maria de Lourdes, por todo incentivo, motivação e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia, e ao laboratório de Interação Planta-Patógeno, pela imensa oportunidade de crescimento profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Unidade Acadêmica de Garanhuns pela oportunidade de conhecimento e formação profissional.

Ao Laboratório de Fitopatologia, pela infraestrutura e acolhimento fornecidos no processo de conhecimento da área.

Ao Prof<sup>o</sup>. Ueder Pedro Lopes, por acreditar no meu potencial, pela dedicação e por toda orientação e ensinamento durante a realização deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Fabrício Ávila Rodrigues pela oportunidade e enriquecimento do meu trabalho com seus ensinamentos.

A todos os professores do curso de Agronomia, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada, por me ajudarem a superar os desafios.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Caracterização da instituição.....	10
1.2 Interação planta-patógeno .....	12
1.3 Estruturas de defesa pré-existentes .....	12
1.4 Estruturas de defesa pós-formadas .....	13
1.5 Inibição bioquímica .....	14
1.6 Resistência de plantas x nutrição mineral .....	14
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	17
2.1 Técnicas experimentais para determinação de estresse em plantas.....	17
2.1.1 IRGA (Infra-red gas analyzer) .....	17
2.1.2 Fluorescência da clorofila “a”: fluorômetro de imagem .....	19
2.1.3 Leitura de pigmentos .....	21
2.1.4 Extravasamento de eletrólitos .....	22
2.1.5 DAB (3,3-diaminobenzidine) .....	23
2.1.6 Bomba de pressão ou bomba de Sholander .....	23
2.2 Acompanhamento de experimentos .....	25
2.2.1 Controle de <i>Hemileia vastatrix</i> em plantas de café e susceptibilidade/resistência de genótipos de cafeeiro .....	25
2.2.2 Teste com novas moléculas para controle da ferrugem asiática da soja .....	27
2.2.3 Inibição <i>in vitro</i> de <i>Fusarium solani</i> a compostos fenólicos .....	28
2.3 Microtomia de tecido foliar de soja .....	29
2.4 Técnicas de microscopia .....	31
2.5 Troca e preparo de solução nutritiva: sistema hidropônico .....	35
2.6 Testes bioquímicos .....	37
2.6.1 Quantificação de proteínas totais: método de Bradford .....	37
2.6.2 Quantificação de quitinase e glucanase .....	38

2.6.3	Quantificação de compostos fenólicos e lignina .....	39
2.6.4	Quantificação de catalase .....	39
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
4	REFERÊNCIAS .....	42



## RESUMO

O estágio supervisionado foi realizado no laboratório de Interação Planta-Patógeno, localizado no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, no estado de Minas Gerais, no período de 18/10/2018 a 17/12/2018. Durante este período, foram empregadas metodologias para identificação de estresse em plantas e o estudo sobre a interação entre plantas e seus patógenos. As plantas estão sujeitas ao ataque corriqueiro de doenças, acarretando diversos processos fisiológicos e bioquímicos, como resposta aos danos provocados pelos microrganismos. Fatores bióticos e abióticos podem induzir o estresse em plantas, que pode ser identificado através de ferramentas e técnicas experimentais, capazes de elucidar o processo de interação entre planta e patógeno. No processo de infecção, os agentes patogênicos induzem e empregam seus mecanismos de ataque para garantir sucesso na penetração e colonização dos tecidos. Após o reconhecimento dos microrganismos patogênicos e de seus danos, as plantas, por sua vez, lançam mão de mecanismos de defesa estruturais e/ou bioquímicos, que são capazes de evitar ou retardar o processo de infecção. Foram utilizadas técnicas fisiológicas como, avaliação de fotossíntese através do IRGA; análise da fluorescência da clorofila “a” através fluorômetro de imagem; quantificação de pigmentos em espectrofotômetro, etc. Também foram utilizados métodos bioquímicos para análise e quantificação de compostos inibitórios de microrganismos. Durante esse período, ocorreu o acompanhamento de experimentos com indução de resistência em plantas por meio da nutrição mineral. Desta forma, o estágio proporcionou um maior domínio teórico e prático de técnicas avançadas para estudo do processo de interação entre hospedeiro e patógeno.

**Palavras-chave:** Resistência de plantas; nutrição mineral; fisiologia do parasitismo.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Caracterização da instituição

A Universidade Federal de Viçosa originou-se da Escola Superior de Agricultura e Veterinária (ESAV), criada pelo Decreto 6.053, de 30 de março de 1922. Em 1927 foram iniciadas as atividades didáticas, com cursos fundamental e médio, e no ano seguinte, o curso superior de Agricultura.

Visando ao desenvolvimento da escola, em 1948, o Governo do Estado a transformou em Universidade Rural do Estado de Minas Gerais (UREMG). Graças à sua sólida base, a qual era composta pela Escola Superior de Agricultura, pela Escola Superior de Veterinária, pela Escola Superior de Ciências Domésticas, pela Escola de Especialização (Pós-Graduação), pelo Serviço de Experimentação e Pesquisa e pelo Serviço de Extensão, e a seu contínuo desenvolvimento, a UREMG adquiriu renome em todo o país, o que fez o governo federal a federalizá-la, com o nome de Universidade Federal de Viçosa (UFV) em 15 de julho de 1969.



**Figura 1.** Universidade Federal de Viçosa. FONTE: Portal UFV

A instituição vem expandindo nas áreas de conhecimento, tais como ciências agrárias, ciências biológicas e da saúde, ciências exatas e tecnológicas e ciências humanas, letras e artes. Seus cursos são distribuídos nos campus Florestal, Rio Paranaíba e Viçosa, o qual possui 45 dos 67 cursos existentes na universidade.

Por tradição, a área de ciências agrárias é a mais desenvolvida na UFV, sendo conhecida e respeitada no Brasil e no exterior. O reconhecimento externo pode ser constatado no excelente desempenho dos egressos do curso, com alta empregabilidade e exercendo funções de lideranças na área empresarial e política. Outros indicadores que qualificam o curso de Agronomia da UFV são as avaliações realizadas pelo Ministério da Educação e Cultura. Desde a implantação do sistema de avaliação de cursos superiores,

o Enade, o curso de Agronomia da UFV tem obtido conceitos que o coloca em destaque entre os cursos equivalentes do País. Por iniciativa da Editora Abril, responsável pela publicação da revista Guia do Estudante, tem sido feito ordenamento dos cursos superiores do Brasil e, em todas as edições, o curso de Agronomia de Viçosa tem conquistado o grau máximo.

O Departamento de Fitopatologia da UFV foi criado, oficialmente, junto com a instalação do Centro de Ciências Agrárias, no ano de 1978. O Prof. Geraldo Martins Chaves foi o primeiro chefe do Departamento e seu grande incentivador. O departamento possui 17 laboratórios de pesquisa, coordenados pelos docentes do departamento. A maioria dos laboratórios está localizada no Edifício Sylvio Starling Brandão (Figura 2). São desenvolvendo atividades nas áreas de Bacteriologia, Biologia de Populações, Controle biológico de doenças de plantas, Controle biológico de fitonematóides, Epidemiologia, Genômica, Interação Planta-Patógeno, Micologia, Nematologia, Patologia de sementes e de Pós-colheita, Patologia florestal, Patologia florestal molecular, Proteção de plantas, Virologia vegetal e molecular e Virologia (Portal UFV).



**Figura 2.** Edifício Sylvio Starling Brandão, onde está localizado o departamento de fitopatologia.  
FONTE: Portal UFV

## **1.2. Interação planta-patógeno**

As doenças de plantas podem ser caracterizadas como um mau funcionamento das células do hospedeiro e seus tecidos que resulta de uma irritação contínua gerada por um agente patogênico ou pelo ambiente (AGRIOS, 2004). Este desequilíbrio nas funções da planta é prejudicial e leva ao desenvolvimento de sintomas, provocando danos ao hospedeiro com este tipo de interação (TEIXEIRA, 2011).

A interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta pela sobrevivência entre dois organismos. Nessa batalha entre a planta e o patógeno, a fisiologia do parasitismo procura explicar as bases bioquímicas e fisiológicas do fenômeno. De um lado, o patógeno lança mão de suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, enquanto este, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno. A interação hospedeiro-patógeno deve ser visualizada como um sistema único e totalmente novo, o qual depende da planta e do patógeno em íntima relação com o meio ambiente. O hospedeiro mostra-se como vencedor quando a doença não ocorre (resistência), enquanto os sintomas por ela produzidos (susceptibilidade) indicam o patógeno como vencedor (PASCHOLATI, 1994).

As plantas, diferentemente dos animais, não possuem sistema imunológico para enfrentar certas situações adversas. Esse fato, associado à sua imobilidade, fez com que elas aperfeiçoassem, ao longo do tempo em suas células, tanto defesas pré-formadas quanto induzidas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). De acordo com Agrios (2004), as plantas se defendem contra patógenos por uma combinação de armas de dois tipos:

- 1- Características estruturais, que agem como barreiras físicas e inibem a entrada e disseminação do patógeno;
- 2- Reações bioquímicas, que ocorrem em células e tecidos da planta, e produzem substâncias que são tóxicas para o patógeno ou que criam condições que inibem o desenvolvimento do patógeno na planta.

As combinações de características estruturais e reações bioquímicas utilizadas na defesa de plantas são diferentes em diversos sistemas patógeno-hospedeiro. Além disso, dentro de um mesmo sistema patógeno-hospedeiro, as combinações variam com a idade da planta, o tipo de órgão e tecido atacado, a condição nutricional da planta e as condições climáticas (TEIXEIRA, 2011).

## **1.3. Mecanismos de defesa pré-existent**

Uma primeira barreira na planta contra os patógenos é sua superfície. Algumas defesas estruturais estão presentes mesmo antes do patógeno entrar em contato com a planta. Tais estruturas incluem a quantidade e a qualidade da cera e cutícula que cobrem a epiderme das células, a estrutura da parede das células da epiderme, o tamanho, localização e forma dos estômatos e lenticelas, e a presença na planta de tecidos formados por células de parede espessa que impedem o avanço do patógeno (DURBIN, 1988).

Ceras nas superfícies de folhas e frutos formam uma superfície repelente à água e, desse modo, previnem a formação de um filme de água, no qual os patógenos podem ser depositados e germinar (fungos) ou multiplicar (bactéria). Uma camada espessa de pêlos na superfície de uma planta pode também exercer um efeito similar e reduzir a infecção. Uma cutícula espessa pode aumentar a resistência à infecção por patógenos que entram no hospedeiro apenas através de penetração direta. A espessura e rigidez de paredes externas de células da epiderme são aparentemente fatores importantes na resistência de algumas plantas a certos patógenos. Paredes espessas e rígidas de células da epiderme tornam a penetração direta por fungos patogênicos difícil ou impossível. (TEIXEIRA, 2011). As plantas ainda possuem substâncias bioquímicas já presentes em suas células, capazes de inibir ou dificultar a infecção patogênica, como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fitotoxinas e inibidores protéicos, substâncias oriundas do metabolismo secundário.

#### **1.4. Mecanismos de defesa pós-formadas**

Apesar das estruturas de defesa superficiais ou internas das plantas hospedeiras, muitos patógenos conseguem penetrar em seus hospedeiros e produzir vários graus de infecção. Por outro lado, após o patógeno ter penetrado as estruturas de defesa pré-formadas, as plantas usualmente respondem com a formação de um ou mais tipos de estruturas que são mais ou menos eficientes na defesa da planta contra a invasão do patógeno. Algumas estruturas de defesa formadas envolvem os tecidos próximos do patógeno e são chamadas estruturas histológicas de defesa; outras envolvem as paredes de células invadidas e são chamadas estruturas celulares de defesa; outras ainda, envolvem o citoplasma das células sob ataque, e o processo é chamado reação de defesa citoplasmática. Finalmente, a morte de células invadidas pode proteger a planta contra invasão, e é chamada de reação de defesa necrótica ou hipersensitiva (FRY, 1982; AGRIOS, 2004).

Algumas estruturas formadas após o ataque de patógenos são: A formação de camadas de cortiça, que inibe a invasão pelo patógeno ao redor da lesão inicial e também bloqueia a difusão de alguma substância tóxica que o patógeno possa secretar. Camadas de abscisão são formadas em folhas novas e consistem de uma abertura entre duas camadas de células de uma folha delimitando o local da infecção. Sobre a infecção, a lamela média entre estas duas camadas de células é dissolvida através do adelgaçamento da folha. Gradualmente esta área encarquilha, morre e se decompõe, levando consigo o patógeno. Tiloses se formam nos vasos do xilema da maioria das plantas sob várias condições de estresse e durante a invasão pela maioria dos patógenos vasculares. Tiloses consistem em crescimento excessivo do protoplasto de células parenquimatosas adjacentes que são empurradas para dentro dos vasos do xilema através de buracos. As tiloses têm paredes celulósicas e podem, por seu tamanho e número, obstruir completamente os vasos; Diversos tipos de gomas são produzidas por muitas plantas ao redor das lesões após infecção pelo patógeno ou injúria. Secreção de goma é mais comum em plantas frutíferas mas ocorre na maioria das plantas. O papel defensivo dos depósitos de gomas vem do fato de que estas são rapidamente depositadas nos espaços intercelulares e nas células adjacentes ao sítio de infecção, formando assim uma barreira impenetrável que encapsula

completamente o patógeno (AGRIOS, 2004). Além disso, as plantas são capazes de produzir fitoalexinas após reconhecimento de microrganismos. As fitoalexinas são definidas como compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, sintetizadas e acumuladas nas plantas após estresses físicos, químicos ou biológicos, como o contato com microrganismos, e seu papel na resistência a patógenos é amplamente estudado, sendo capaz de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos (BRAGA, 2008).

### **1.5. Inibição bioquímica**

Além das características estruturais proverem a planta com vários graus de defesa contra o ataque de patógenos, está se tornando amplamente claro que a resistência de plantas a patógenos depende tanto das barreiras estruturais como das substâncias produzidas em suas células antes ou após a infecção (TEIXEIRA, 2011).

Tecidos e células vegetais respondem à injúria, tanto causada por um patógeno como por um agente químico ou mecânico, através de uma série de reações bioquímicas que parecem ser dirigidas para isolamento do irritante e cicatrização do ferimento. Estas reações são frequentemente associadas com a produção de substâncias fungitóxicas ao redor do sítio de injúria bem como a formação de camadas de tecidos protetores tais como calo e cortiça. Alguns dos compostos produzidos estão presentes em altas concentrações, suficientes para inibir o crescimento da maior parte dos fungos e bactérias que não conseguem infectar aquele hospedeiro. Estes compostos incluem principalmente os compostos fenólicos, como ácidos clorogênico e caféico, produtos de oxidação de compostos fenólicos, e também as fitoalexinas, muitas das quais são também compostos fenólicos (AGRIOS, 2004).

### **1.6. Resistência de plantas x nutrição mineral**

Resistência é aquela característica da planta que suprime o patógeno e o desenvolvimento da doença. A magnitude da resistência pode variar de muito pequena, nos casos em que o desenvolvimento do patógeno é suprimido apenas levemente, a muito grande, nos casos em que, o patógeno não completa a patogênese (FRY, 1982).

Indução de resistência em plantas é a resistência que desenvolve após a pré inoculação das plantas com vários agentes bióticos ou após pré-tratamento com vários agentes químicos ou físicos. Resistência tem sido induzida em uma ampla variedade de plantas contra fungos, bactérias, vírus e até insetos (AGRIOS, 2004).

O estado nutricional da planta tem relação direta com seu crescimento e desenvolvimento, além de ser considerado um dos principais fatores responsáveis pelos mecanismos de defesa em relação aos fatores bióticos (patógenos e insetos pragas) (COLHOUM, 1973). Os elementos minerais estão envolvidos em todos os mecanismos de defesa do vegetal, sejam como componentes integrais ou ativadores, inibidores ou reguladores do metabolismo (SILVEIRA; HIGASHI, 2003).

Uma planta com deficiências nutricionais é normalmente mais vulnerável ao ataque de patógenos do que outra em condições nutricionais ótimas. O equilíbrio nutricional é

importante, pois plantas com excesso de nutrição podem tornar-se, também, mais predispostas às doenças.

Todos os aspectos fisiológicos da resistência estão intimamente relacionados com o “status” nutricional das plantas e refletem tanto uma modificação no ambiente nutricional do patógeno como a produção e acúmulo de compostos inibidores da patogênese. Os nutrientes minerais exercem funções específicas no metabolismo vegetal, afetando, assim, seu crescimento e sua produção. Além disso, a nutrição mineral apresenta envolvimento secundário em termos das funções dos nutrientes no metabolismo vegetal, como alterações na morfologia (forma de crescimento), anatomia (paredes das células da epiderme mais grossas, lignificadas ou silificadas) e composição química (síntese de compostos tóxicos), as quais podem aumentar ou reduzir a resistência das plantas aos patógenos (MARSCHNER, 1995).

Os efeitos dos nutrientes minerais no crescimento das plantas e na produção podem ser explicados conforme as funções que exercem no seu metabolismo. Podem alterar o padrão de crescimento, a morfologia e a anatomia da planta como um todo ou de seus órgãos, e, particularmente a composição química, e conseqüentemente aumentar ou reduzir a resistência de plantas a patógenos e pragas (HUBER et al. 2012; MARSCHNER 2012). Alguns nutrientes possuem destaque na indução de resistência em plantas, como o cálcio, magnésio, potássio, silício e níquel.

Admite-se que o cálcio seja indispensável para a manutenção da estrutura e o funcionamento normal das membranas celulares. A permeabilidade das membranas a compostos hidrofílicos depende consideravelmente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{H}^+$  no meio (FAQUIN, 2005). O cálcio é usado na síntese de novas paredes celulares, no fuso mitótico, na atuação normal das membranas, e como mensageiro secundário para um número de respostas das plantas para sinais ambientais e hormonais (TAIZ; ZIEGER, 1991), e também é indispensável para o desenvolvimento normal do sistema radicular (BASSO; SUZUKI, 2001; TAIZ; ZIEGER, 1991). Este mineral também desempenha outras importantes funções nas plantas, está envolvido na estrutura e estabilidade de membrana celular durante estresse por altas temperaturas, bem como nos períodos de frio (TAIZ; ZIEGER, 1991), e sua deficiência causa a desintegração de paredes com subseqüente colapso dos tecidos (BONATO et al., 1998).

O Magnésio (Mg) desempenha funções importantes na fisiologia vegetal por participar dos processos da fotofosforilação, da fixação fotossintética do dióxido de carbono, da síntese proteica, do carreamento do floema, da utilização dos fotoassimilados, na geração de espécies reativas de oxigênio e na foto-oxidação foliar (HERMANS et al., 2005). Este elemento pode promover resistência aos fatores desfavoráveis. A função mais conhecida do Mg é a de compor a molécula da clorofila, que são porfirinas magnesianas. Além desta, outras importantes funções são desempenhadas pelo Mg, como a ativação enzimática. O Mg ativa mais enzimas de qualquer outro elemento na planta. Neste caso, o principal papel do Mg é atuar como cofator de enzimas fosforilativas, formando uma ponte entre o pirofosfato do ATP ou ADP e a molécula da enzima (FAQUIN, 2005)

O potássio (K) não faz parte de qualquer composto orgânico, portanto, não desempenha função estrutural, mas contribui para a regulação osmótica da planta. Além destas funções, o  $\text{K}^+$  atua na ativação enzimática e no processo de absorção iônica. Mais

de 50 enzimas são dependentes do K para sua atividade normal, citando-se as sintetases, oxiredutases, desidrogenases, transferases e quinases. A nutrição potássica também está ligada à regulação do potencial osmótico das células das plantas, além da expansão celular e a abertura e fechamento dos estômatos (FAQUIN, 2005).

O silício (Si) tem aumentado a resistência de várias espécies de plantas às pragas, doenças, bem como a diversos tipos de estresses abióticos tais como altas temperaturas, falta de água no solo e toxidez de ferro e manganês às raízes quando teores elevados desses elementos se acumulam nos tecidos dessas espécies, na sua maioria monocotiledôneas (MITANI; M.A.; 2005; DATNOFF et al., 2007). Apesar de não se conhecer profundamente seus mecanismos que induzem a resistência de plantas, há hipótese da formação de uma barreira física abaixo da cutícula após a polimerização do ácido monossilícico e de que o Si potencializa mecanismos de defesa em plantas e não atua apenas de forma passiva na resistência (PEREIRA et al, 2009).

O níquel (Ni) reconhecido recentemente como micronutriente essencial, também estimula a produção das fitoalexinas, aumentando assim a resistência a doenças (MALAVOLTA, 2008). Trabalhos de Graham et al. (1985) e Brown et al. (1987) demonstraram que o efeito do níquel no controle de doenças decorre principalmente devido a alterações metabólicas induzidas por meio da planta hospedeira, levando à redução da severidade da doença.

Tem-se conhecimento do efeito de alguns nutrientes aplicados na adubação sobre a suscetibilidade de plantas às doenças. Estudos antigos já demonstram a relação entre estado nutricional e resistência. A aplicação de nitrogênio na forma de uréia em altas concentrações predispõe plantas de arroz à brusone, causada por *Magnaporthe grisea* (BUIR et al., 1959). Com relação ao fósforo, a deficiência desse elemento aumentou a severidade da podridão radicular em soja, causada por *Rhizoctonia solani* (CASTANO; KERNKAMP, 1956). A severidade do cancro da haste da soja, causada por *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* foi reduzida com a adubação potássica (MASCARENHAS et al., 1997). Em alguns patossistemas, como *Erwinia carotovora subsp. carotovora* e tubérculos de batata, têm-se evidenciado que o aumento no teor de cálcio no tubérculo elevou a resistência à podridão mole (MCGUIRE; KELMAN, 1984). A baixa severidade da brusone, em panículas de arroz, foi associada a altas concentrações de potássio e zinco e baixas concentrações de nitrogênio, fósforo e magnésio (FILIPPI; PRABHU, 1998).

Atualmente, essa linha de pesquisa mantém-se alvo de estudo. Em trabalhos sobre nutrição mineral de plantas, Rodrigues et al (2017) comprovou aumento de resistência em plantas de trigo à brusone, pelo uso de silício e magnésio. Em aplicação de doses crescentes de cálcio em plantas de trigo, Debona et al (2017) observou redução na severidade da brusone e que o nível de expressão dos marcadores do gene das vias salicílico e do ácido jasmônico, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia liase, peroxidase e polifenol oxidase foi maior em plantas com doses maiores de cálcio.



## **2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS:**

### **2.1. Técnicas experimentais para determinação de estresse em plantas**

O estresse pode ser definido como uma situação desvantajosa à planta e que promove mudanças na mesma. O estresse pode ser provocado por fatores abióticos (estresse hídrico, por excesso ou escassez; estresse salino; excesso ou carência de nutrientes; altas ou baixas temperaturas; excesso ou falta de luminosidade; baixas concentrações de CO<sub>2</sub>; metais pesados, etc.), ou ainda por fatores bióticos (microrganismos; pragas; plantas daninhas).

Através de ferramentas e técnicas experimentais é possível, de forma eficaz e segura, determinar quando as plantas estão passando por condições de estresse e como essa planta está sendo afetada (danos no aparato fotossintético, no sistema vascular, nas membranas celulares, etc.).

A seguir, são apresentadas algumas técnicas rotineiramente utilizada para determinar o estresse em plantas:

#### **2.1.1. IRGA (Infra-red gas analyzer)**

Os IRGAs medem concentrações de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A taxa de absorção de CO<sub>2</sub> por uma folha pode ser medida colocando a folha numa câmara transparente, fazendo passar ar sobre a folha e medindo com o IRGA a variação da concentração de CO<sub>2</sub> após a passagem pela câmara (CARVALHO, 2014).

Atualmente, a maioria dos sistemas de medida do CO<sub>2</sub> utilizam o IRGA num modo diferencial, o que permite detectar variações muito pequenas na concentração de CO<sub>2</sub>. Assim, o ar passa pela coluna de referência antes de entrar na câmara que contém a folha, seguindo depois para a coluna de análise. A diferença entre os valores das duas colunas fornece o CO<sub>2</sub> consumido em cada momento pelo tecido foliar (CARVALHO, 2014).

Podemos utilizar outras determinações com o IRGA, importantes para o estudo das plantas sob condições de estresse, seja ele abiótico ou biótico. Uma dessas utilizações é a resistência ou condutância estomática. Os estômatos são a principal resistência ao fluxo difusivo do vapor de água através das folhas. Medições da resistência estomática (rs) ou do seu inverso, a condutância estomática (gs), são importantes para estabelecer a influência dos estômatos na transpiração e/ou na troca de outros gases entre os tecidos foliares e a atmosfera envolvente (CARVALHO, 2014).

Este sistema de medida é constituído essencialmente por três partes:

- Câmara de medida;
- Analisador de gás em modo diferencial para o CO<sub>2</sub> e para o vapor de água;

- Unidade munida de um visor digital, que centraliza as informações recebidas do IRGA e dos sensores instalados na câmara e que contêm ainda as bombas para a circulação de ar e os controladores de fluxo.

Em condições de estresse biótico, quando plantas são atacadas por patógenos, a necrose acarretada pelo ataque de microrganismos gera distúrbios fisiológicos no sistema fotossintético da planta e perda de área fotossintética ativa, provocando uma redução na taxa de fotossíntese.

Para determinação da fotossíntese (Figura 3) foram utilizadas plantas de arroz tratadas com diferentes doses de potássio. O experimento foi composto por plantas testemunhas, sem inoculação de doença e plantas inoculadas com *Bipolaris oryzae*, agente causal da mancha parda do arroz. Inicialmente, o equipamento foi calibrado, e posteriormente as folhas foram colocadas e mantidas na câmara de leitura. Antes do procedimento de leitura, observou-se a estabilidade dos gráficos de condutância estomática e da fotossíntese, para evitar fatores de variação. Em seguida, foram feitas as leituras e os dados foram salvos para análise. Os dados demonstraram que plantas inoculadas apresentavam menor taxa de fotossíntese, acarretada pela perda de área fotossintética e distúrbios no aparato fotossintético. Entretanto, plantas tratadas com doses intermediárias de potássio apresentaram melhor eficiência fotossintética. Já as plantas testemunhas apresentaram taxa fotossintética superior, quando comparadas as plantas inoculadas.



**Figura 3.** Utilização de IRGA para avaliação de fotossíntese em plantas de arroz inoculadas com *Bipolaris oryzae*.

É importante salientar que, para o uso desse equipamento, devemos levar em consideração alguns fatores ambientais, como a umidade em torno de 50 a 70% e temperatura em torno de 25 °C. Em temperaturas mais elevadas, deve-se ligar o “cooler” do equipamento, e deve-se evitar seu uso em dias chuvosos, nublados ou com alta umidade, para evitar erros na medição.

### 2.1.2. Fluorescência da clorofila “a”: fluorômetro de imagem

A fotossíntese constitui a base da produção de uma cultura. Estima-se que 90% da matéria seca total de um vegetal resultem diretamente do processo fotossintético (JIAO; JI; LI, 2003). A absorção e uso da energia luminosa pelos vegetais podem ser estimados através da análise da fluorescência da clorofila. Segundo Baker e Rosenqvist (2004), mudanças na emissão da fluorescência da clorofila são indicativos de alterações na atividade e aparato fotossintético.

Em temperatura ambiente (temperatura fisiológica, 20 a 25 °C), a fluorescência é uma luz emitida e exibe um ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm (KRAUSE; WEIS, 1994). Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas (Dissipação Fotoquímica+ Fluorescência + Dissipação Não-Fotoquímica) são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causarão alterações complementares na emissão da fluorescência. Sendo assim, alterações na fluorescência podem mostrar a ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético (CAMPOSTRINI, 2001).

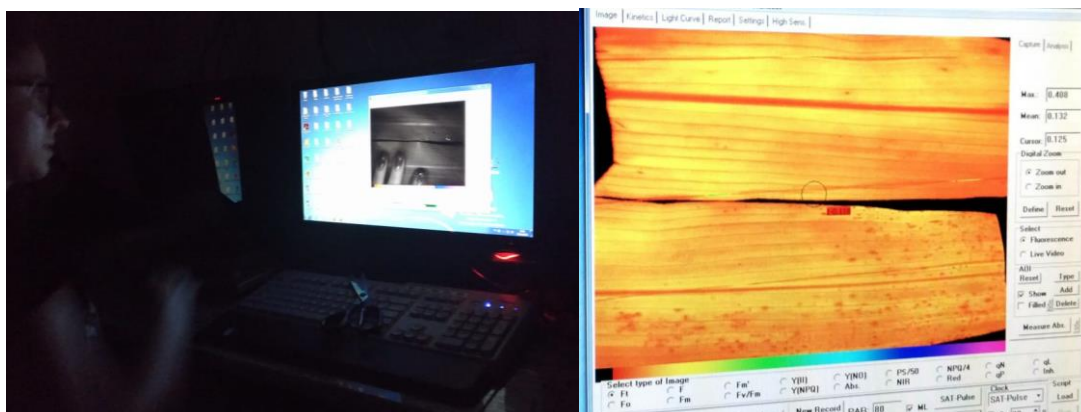
A análise da fluorescência da clorofila “a” é capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresse e injúrias no processo fotossintético causados por fatores bióticos ou abióticos. As mudanças na cinética de emissão de fluorescência da clorofila “a” a partir de organismos fotossintéticos, são resultados de frequentes modificações na atividade fotossintética, principalmente com relação a eficiência quântica do transporte de elétrons através do fotossistema II (FSII) em folhas (YUSUF et al. 2010; BAKER; ROSENQVIST, 2004). Dentre os diversos parâmetros de fluorescência da clorofila que podem ser medidos, o máximo rendimento quântico fotoquímico do FSII (Fv/Fm), frequentemente avaliado pela máxima taxa de fluorescência da clorofila “a”, tem sido amplamente utilizado para comparar tecidos saudáveis e danificados devido a fatores bióticos (ROUSSEAU et al. 2013). Folhas saudáveis apresentam valores entre 0.80 a 0.65, sendo que abaixo desse intervalo indica-se que os centros de reação do FSII foram danificados (CHAVES, 2015).

Demonstrações de que a fluorescência da clorofila pode ser usada para estimar, rapidamente e de forma não invasiva, a eficiência do transporte de elétrons através do FSII e que a eficiência de operação deste FSII está correlacionada à assimilação de CO<sub>2</sub> tem levado à utilização de parâmetros da fluorescência da clorofila para examinar o desempenho fotossintético de plantas sob condições de laboratório, em condições controladas e em campo (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

Para avaliação da fluorescência da clorofila “a” utilizou-se folhas de plantas de milho inoculadas com *Colletotrichum graminicola*, utilizando silício na adubação, folhas inoculadas com *C. graminicola* sem silício e folhas testemunhas, onde não houve inoculação do patógeno. As folhas foram coletadas e mantidas em papel umedecido, para manter o turgor das mesmas. Em seguida, as folhas foram aclimatadas no escuro durante 1 hora, como objetivo de “limpar” todos os elétrons excitados da cadeia transportadora de elétrons e “esvaziar” os “pools” aceitadores. Na condição de escuro (centros de reação abertos), várias enzimas do Ciclo de Calvin tornam-se desativadas e devem ser ativadas pela luz. Ainda, os metabólitos produzidos no Ciclo de Calvin devem alcançar níveis

apropriados para que a fixação do CO<sub>2</sub> possa ocorrer em taxas ótimas. Sendo assim, existe um “período de indução fotossintética” quando se efetua a rápida transferência do tecido fotossintetizante da condição de escuro para a presença da luz. Neste período, a fixação do CO<sub>2</sub> é baixa. Durante o período de indução fotossintética, os aceptores localizados nas membranas dos tilacóides estão aptos a receberem elétrons das moléculas excitadas pelos fótons. Entretanto, a fase bioquímica da fotossíntese não está ativa e nem otimizada. Como resultado, após a iluminação, o número de aceptores aptos a aceitarem os elétrons rapidamente reduz a zero, pois todos os sítios de redução estão ocupados em consequência da ativação da fase fotoquímica pela luz. Consequentemente, a energia absorvida pelas moléculas de clorofilas deve ser dissipada em fluorescência e em calor (CAMPOSTRINI, 2001).

Antes de dar início à avaliação da fluorescência, o equipamento foi calibrado usando uma folha de papel branca, no lugar das folhas das plantas de milho, para verificação dos parâmetros fotossintéticos (Fv/Fm; Y(II); Y(NO); FM), afim de evitar erros de leitura. Em seguida, as folhas foram colocadas no fluorômetro de imagem para serem expostas a um pulso de luz de elevada intensidade. Esse pulso de luz irá excitar os elétrons, que deverão seguir o caminho da cadeia transportadora de elétrons, dando início ao processo fotossintético. Entretanto, uma vez com o aparato fotossintético danificado, a planta é incapaz de utilizar essa energia no processo fotoquímico, e como consequência essa energia é dissipada em forma de calor e fluorescência, identificada pelo fluorômetro através de lesões escuras no tecido foliar, resultado de um declínio do processo fotoquímico.



**Figura 4.** Análise da clorofila “a” em plantas de milho, usando um fluorômetro de imagem.

Para o teste de fluorescência (Figura 4) foram utilizadas plantas de milho inoculadas com *Colletotrichum graminicola* e plantas sadias, tratadas com silício. No experimento foi possível observar lesões no tecido foliar em ambas as plantas inoculadas, demonstrando danos ao aparato fotossintético, como consequência da infecção causada pelo patógeno. Entretanto, folhas de plantas adubadas com silício apresentaram menor porcentagem de tecido lesionado, comprovando que o silício pode induzir a resistência da planta, através do aumento da espessura da parede celular, promovendo o atraso ou até

impedindo a penetração do fungo. Já as plantas saudáveis não apresentaram nenhuma lesão em suas folhas.

### 2.1.3. Leitura de pigmentos

Os pigmentos, clorofilas e carotenóides, são extremamente importantes no processo fotossintético das plantas e suas concentrações nas folhas podem indicar o estado fisiológico da planta em condições de estresse. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas, ocorrendo nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Estudos em uma grande variedade de plantas caracterizaram que os pigmentos clorofilianos são os mesmos. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devidas à sua distribuição nas folhas e à presença variável de outros pigmentos associados, como os carotenóides, os quais sempre acompanham as clorofilas (VON ELBE, 2000).

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. As clorofilas *a* e *b* são abundantes nas plantas verdes, sendo que a clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético, enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios são as clorofilas do tipo *b* e os carotenóides (TAIZ; ZIEGER, 2004). As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, sendo esta organela responsável pela fotossíntese, isto é, onde ocorrem as duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Tais organelas, além das clorofilas, contêm outros pigmentos chamados acessórios, como os carotenóides (carotenos e xantofilas).

Para leitura de pigmentos (Figura 5) utilizou-se plantas de arroz inoculadas com *Bipolaris oryzae* e plantas testemunhas, ou seja, sem inoculação. Foram cortados fragmentos dessas folhas (cinco fragmentos com 1 cm<sup>2</sup> cada) e colocados em tubos de ensaio com 5mL de DMSO, substância utilizada como extratora. Os tubos foram mantidos protegidos da luz por 24 horas. Em seguida, esse extrato foi transferido para uma cubeta e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro. Após leitura dos dados, observou-se que as plantas testemunhas apresentaram maiores concentrações de pigmentos, demonstrando que as plantas apresentavam folhas intactas e com alta sanidade. Entretanto, as folhas das plantas inoculadas demonstraram menor concentração de pigmentos, resultado de sua degradação e clorose do tecido, acarretados pela doença.



**Figura 5.** Processo para extração e análise de pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz.

#### 2.1.4. Extravasamento de eletrólitos

O ataque de patógenos pode causar a produção de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo os peróxidos, que são moléculas tóxicas às plantas e aos agentes patogênicos. As moléculas de peróxido são capazes de gerar o rompimento da membrana celular, chamada de peroxidação lipídica, provocando perda de seletividade e extravasamento de elétrons, íons e sais da célula para o meio externo. Portanto, quanto maior o dano causado pela doença, maior será o extravasamento de eletrólitos através das células.

Para medir o extravasamento de eletrólitos (Figura 6), foram utilizadas folhas de arroz inoculadas com *Bipolaris oryzae* e folhas saudáveis. As folhas foram cortadas em cinco fragmentos circulares de 1 cm<sup>2</sup> cada, lavadas e colocados em tubos de ensaio com 20 mL de água deionizada. Os fragmentos foram mantidos por duas horas na solução de água, para posteriormente prosseguir com a leitura em condutivímetro. Antes de medir o extravasamento, o equipamento foi calibrado para minimizar ou evitar erros de leitura.



**Figura 6.** Análise de extravasamento de eletrólitos em plantas de arroz, usando um condutivímetro.

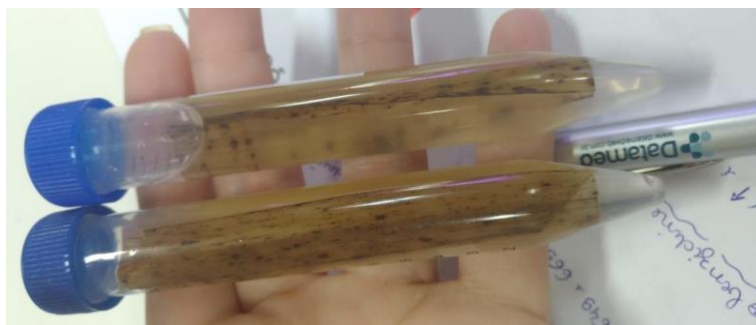
Ao final da leitura foi possível observar que as folhas de plantas saudáveis apresentaram menor extravasamento de eletrólitos, uma vez que as membranas de suas células estavam intactas, já que não houve danos acarretados pela doença. Em contrapartida, as folhas de plantas inoculadas apresentaram valores bem superiores de extravasamento, indicando o rompimento de suas membranas celulares pelo ataque do patógeno.

### 2.1.5. DAB (3,3-diaminobenzidina)

Os métodos de coloração imunoenzimáticos utilizam as reações enzima-substrato para converterem os cromogênios incolores em produtos finais coloridos, adequados a serem observados por microscopia óptica. Além disso, a variedade de enzimas e cromogênios disponíveis permitem a escolha de cor para o produto final da reação (LOPES, 2016).

O cromogênio mais favorável é a 3,3' diaminobenzidina (**DAB**), que após oxidação forma um polímero castanho, insolúvel e estável no local do antígeno alvo (LOPES, 2016).

Este método possibilita a observação do peróxido no tecido foliar, ou seja, o peróxido sintetizado após o ataque do patógeno reage com o DAB, promovendo pontuações escuras do tecido da planta como resultado da reação. Assim, quanto maior a quantidade de peróxido presente na folha, maior a infecção do patógeno. Entretanto, é um método apenas visual, para simples demonstração de um tecido atacado.

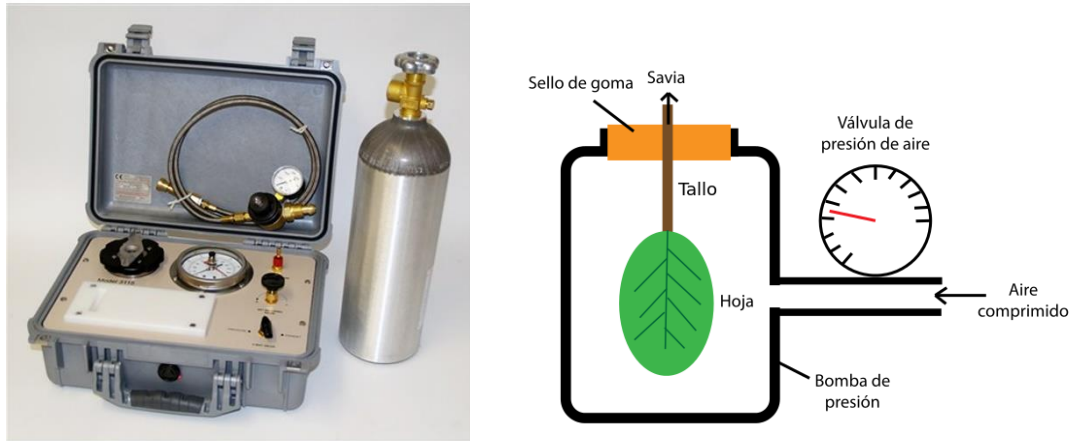


**Figura 7.** Folhas de arroz coradas com 3,3-diaminobenzidina (DAB) para visualização da presença de peróxido após ataque patogênico.

### 2.1.6. Bomba de pressão ou bomba de Scholander

Uma bomba de pressão, câmara de pressão ou bomba de Scholander é um instrumento que pode medir o potencial aproximado de água dos tecidos da planta. Uma folha, um segmento de caule ou haste são colocados dentro de uma câmara selada. Gás pressurizado é lentamente adicionado à câmara. Conforme a pressão aumenta, ela atinge o ponto em que a seiva deixa o xilema e é visualizada na extremidade cortada do caule.

A pressão necessária para isso é a mesma e com o sinal oposto ao potencial hídrico da usina. Esse potencial é negativo devido às trocas gasosas que ocorrem através dos estômatos, pois trazem uma perda líquida de água. A razão pela qual isso acontece é o baixo potencial hídrico da atmosfera e, portanto, a planta perde água constantemente.



**Figura 8.** Bomba de Sholander e seu funcionamento. FONTE: tecncal.com.br

Patógenos podem atacar e colonizar o xilema e raízes e, como resultado, o potencial hídrico da planta é afetado. Com isso, para observação do extravasamento da seiva é necessária uma pressão muito elevada, quando comparado às plantas saudáveis. Portanto, este é um método eficaz para estudo de plantas acometidas por patógenos do sistema vascular e que atacam sistema radicular, como fusarium, bactérias colonizadoras de xilema e nematóides. Esta técnica pode ser usada como um indicador para escolha de melhores cultivares de plantas para determinados patógenos.



## 2.2. Acompanhamento de experimentos

### 2.2.1. Controle de *Hemileia vastatrix* em plantas de café e suscetibilidade/resistência de genótipos de cafeeiro

A ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é causada por *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., espécie descrita por Berkeley, para enquadrar a ferrugem encontrada em café, em 1869, no Sri Lanka (ZAMBOLIM et al., 1997). Os danos causados pela ferrugem são, principalmente, indiretos, pela indução de desfolha por ocasião da colheita. A queda precoce das folhas resulta em menor vingamento da florada, menor vingamento dos chumbinhos e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos, mais de 50% da produção do cafeeiro (GREE, 1993; ZAMBOLIM et al., 1997).

Um dos maiores desafios para os pesquisadores é a constante busca por métodos alternativos de controle da ferrugem, que causem menor impacto ambiental (COSTA et al, 2007). Atualmente, o principal controle é feito através de métodos químicos, com utilização de fungicidas protetores e sistêmicos. Entretanto, tem-se utilizado variedades resistentes ou tolerantes para controle da doença.

Durante o estágio, realizou-se o acompanhamento de dois experimentos com ferrugem do cafeeiro. No primeiro ensaio, com foco no controle químico, foi utilizado fungicida via solo e ácido húmico, em casa de vegetação. Neste caso, aplicou-se o fungicida no solo e, em seguida, plantas de café (variedade caturra) foram inoculadas a seco com urediniósporos de *H. vastatrix* raça II (Figura 9), que foram espalhados sobre a face abaxial da folha com auxílio de pincel. Posteriormente, foi borrifada água nas folhas e colocados sacos plásticos nas mesmas, para manter umidade. As plantas foram mantidas no escuro por 48 horas em câmara úmida.



**Figura 9.** Inoculação de plantas de café com *Hemileia vastatrix*.

O objetivo do experimento, em parceria com uma empresa privada, foi observar a eficiência do fungicida via solo, bem como a melhor dosagem, e se existiria perda de eficiência ou aumento de desempenho do mesmo na interação com o ácido húmico. As substâncias húmicas são compostos orgânicos que participam dos tratamentos nutricionais e ajudam a otimizar o manejo, e estão presentes em formulações de alto desempenho de fertilizantes fluidos. As substâncias húmicas estão associadas à melhora da estrutura do solo devido ao aumento da capacidade de troca catiônica (CTC), o que propicia também a retenção de água e promove um melhor aproveitamento de nutrientes fixados. Com um bom sistema radicular, a planta se desenvolve com mais vigor e há reflexo direto no aumento produtividade. Diante dos benefícios do ácido húmico, a empresa tem a pretensão de lançar um “pacote tecnológico”, juntamente com o fungicida, para os cafeicultores.

Após condução do ensaio, foi notório que o fungicida via solo foi capaz de controlar a doença (Figura 10), quando comparado a testemunha (sem aplicação de fungicida). Além disso, visualmente, o ácido húmico não afetou a eficiência do fungicida.



**Figura 10.** Folhas de café com 30 dias após inoculação com *H. vastatrix* em diferentes tratamentos.

O segundo experimento, também conduzido em casa de vegetação, visou apenas observar a susceptibilidade de diferentes variedades de café a diferentes raças de *H. vastatrix*. Para isso, variedades conhecidas como resistentes ou tolerantes à ferrugem do cafeeiro foram inoculadas à seco com diferentes raças de *H. vastatrix* e mantidas no escuro por 48 horas em câmara de incubação, com umidade adequada e temperatura controlada. As folhas foram analisadas ao longo do tempo, levando em consideração severidade, período de latência, diâmetro da lesão, etc., para observação da suscetibilidade da planta. Ao final do ensaio, observou-se que muitas variedades conhecidas como tolerantes ou até mesmo resistentes, demonstram suscetibilidade ao patógeno.

### 2.2.2. Teste com novas moléculas para controle da ferrugem asiática da soja

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é uma das doenças mais severas que incide na cultura de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], com danos variando de 10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (SINCLAIR; HARTMAN, 1999; YORINORI et al., 2005). Os sintomas mais comuns da doença são lesões de coloração palha a marrom-escura ou marrom-avermelhada, ou manchas com uma ou mais urédias, que encerram os uredósporos. Os sintomas iniciais da doença são caracterizados por lesões pequenas, de aspecto encharcado, que gradualmente aumentam em tamanho, tornando-se cinzas a castanhas ou marrons (ANDRADE et al, 2002).

Diante desse cenário preocupante, empresas estão buscando estudar novas moléculas capazes de controlar de forma eficiente a doença. Dessa forma, em parceria com uma empresa privada, conduziu-se um experimento em casa de vegetação, a fim de estudar novas molécula e verificar a melhor dosagem para o controle da ferrugem asiática da soja.

Para o ensaio (Figura 11), plantas de soja foram semeadas em vasos e mantidas em casa de vegetação, por volta do estágio de desenvolvimento V5 (quinto nó). Foram feitas as aplicações dos produtos sob teste e produtos comerciais, ambos em diferentes doses. No dia seguinte, ocorreu a inoculação das plantas com *P. pachyrhizi*. A suspensão foi preparada fazendo-se a homogeneização de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em água destilada esterilizada e 0,5% de tween. A suspensão foi aplicada na face abaxial das folhas de soja, e estas mantidas em câmara úmida por 48 horas.



**Figura 11.** Aplicação de novas moléculas de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja.

Após o período de inoculação, foram feitas avaliações periódicas da severidade da doença, bem como testes bioquímicos, com o objetivo de comprovar a eficiência dos novos fungicidas, quando comparados aos produtos já disponíveis no mercado.

### 2.2.3. Inibição *in vitro* de *Fusarium solani* por compostos fenólicos

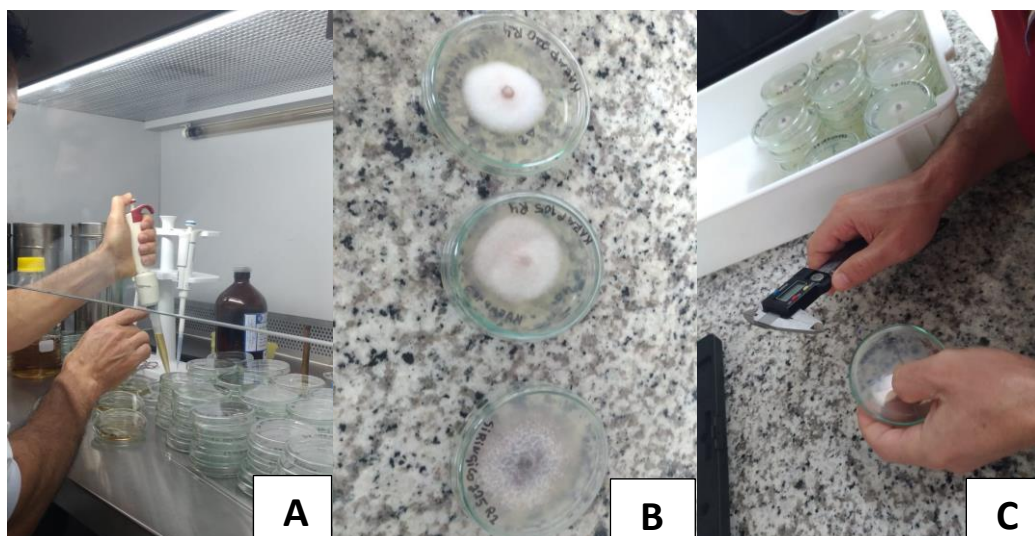
Em experimentos anteriores com *F. solani* em plantas de milho (realizado pela equipe de pesquisa do laboratório de Interação Planta-Patógeno), causando podridão do colmo, observou-se que algumas plantas apresentaram maior tolerância ao ataque do patógeno. Diante disso, os colmos das plantas foram coletados para análise química, e foi possível comprovar que as plantas tolerantes apresentavam maiores concentrações de compostos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido siríngico, apigenim, mirecetina, ácido p-cumárico, etc.).

O termo “compostos fenólicos” abrange um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila. Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. Em geral, tendem a ser solúveis em água, uma vez que ocorrem frequentemente na forma de glicosídeos, e são localizados usualmente nos vacúolos celulares. As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos estão muito bem estudadas. As vias do ácido chiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Compostos fenólicos são bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (LO; NICHOLSON, 2008). O efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas varia entre os diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995). Segundo Vidhyasekaran (1988), diversas substâncias fenólicas estão associadas à resistência a doenças como, por exemplo, ácido clorogênico, ácido protocatecólico e catecol, floridizina e arbutina (glicosídeos fenólicos).

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros têm função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (YAMADA, 2004).

Após identificação das moléculas, estas foram utilizadas para o teste *in vitro* com *F. solani*, a fim de identificar se estes compostos atuavam diretamente sobre o crescimento micelial do fungo e qual dose apresentava melhor eficiência. Para isso, compostos sintéticos de fenóis foram pesados em ambiente sem iluminação, já que os mesmos são fotossensíveis. Os diferentes compostos foram diluídos em metanol e agitados até total homogeneização, para obtenção dos padrões. Estes padrões foram acrescentados ao meio BDA, ainda fluido, em diferentes concentrações, e posteriormente vertido em placas de Petri (Figura 12.A). Após solidificação do meio, foram colocados discos de meio contendo micélio do patógeno, no centro da placa. Após dois dias, foram

feitas medições (Figura 12.C), com auxílio de paquímetro, do diâmetro de crescimento do fungo e seu desenvolvimento. As avaliações foram realizadas durante duas semanas.



**Figura 12.** Condução de ensaio com *F. solani* em meio de cultura contendo compostos fenólicos (A) e aferição do crescimento micelial (C).

Durante avaliação do crescimento micelial de *F. solani*, foi possível observar uma pequena redução no crescimento do micélio dos fungos em contato com os compostos fenólicos. Ainda foi notória a redução no desenvolvimento do micélio, que se apresentava menos denso e com baixo crescimento aéreo, quando comparados à testemunha.

### 2.3. Microtomia de tecido foliar de soja

Em sua maioria, as células fazem parte de tecidos que precisam ser cortados em fatias finas para exame no microscópio. Esses cortes são feitos em um aparelho denominado micrótomo. Para ser cortado no micrótomo, o fragmento de tecido é geralmente protegido por um material que o envolve e nele penetra, devendo possuir propriedades físicas que facilitem o corte. Os tecidos destinados ao estudo no microscópio óptico são protegidos, isto é, incluídos em uma parafina ou resinas plásticas especiais, e cortados com uma espessura de 1 a 6 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Geralmente, para estudo no microscópio eletrônico, os tecidos devem ser incluídos em resinas mais duras, como as do tipo epóxi. Os cortes para microscópio eletrônico são mais finos, medindo 0,02 a 0,1  $\mu\text{m}$ . Os micrótomos que cortam tecidos incluídos em parafina utilizam navalhas de aço, e os que cortam tecidos incluídos em resinas usam navalhas de vidro ou diamante (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O micrótomo permite que se obtenham cortes com espessura definida, a partir de material rígido ou, quando frágil, infiltrado em suporte adequado. O micrótomo de deslize secciona o material em cortes individuais, enquanto que o rotatório possibilita a formação de uma “fita”, com cortes sequenciais. O preparo das amostras para seccionamento geralmente envolve fixação, desidratação e emblocamento (CAPUTO et al, 2010).

O processo de fixação procura preservar a estrutura celular, sem alterar a química da célula. A fixação paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para os tratamentos posteriores. A fixação evita a autólise celular, impede a proliferação de microrganismos, leva ao endurecimento do tecido para que resista aos tratamentos posteriores. Os fixadores são agentes físicos (calor, frio, dessecação) ou químicos, sendo que estes últimos, coagulam ou precipitam proteínas celulares e endurecem os tecidos.

Os fixadores químicos podem ser simples ou misturas (CAPUTO et al, 2010). Os simples são geralmente soluções aquosas de uma única substância, como:

- ◆ etanol a 70% - precipita as proteínas e os ácidos nucleicos e dissolve os lipídios;
- ◆ ácido acético a 5% - precipita as nucleoproteínas e difunde-se com facilidade;
- ◆ acetona - poderoso solvente de lipídios e preservante de enzimas;
- ◆ tetróxido de ósmio - forte oxidante, muito volátil e irritante;
- ◆ formalina ou formaldeído a 40% - endurece os tecidos, embora não dissolva os lipídios.

Entre os fixadores em misturas, diversas substâncias têm demonstrado poder de fixação superior, a saber:

- ◆ FAA 50 ou 70 - compõe-se de formalina, ácido acético e álcool etílico. O etanol produz retração do protoplasma, enquanto o ácido acético o expande; o álcool e a formalina endurecem os tecidos, enquanto o ácido os amacia;
- ◆ FPA - modificação do fixador anterior, onde o ácido acético é substituído pelo ácido propiônico;
- ◆ Nawaschin - não causa endurecimento nem retração do material, porém possui pequena penetração.

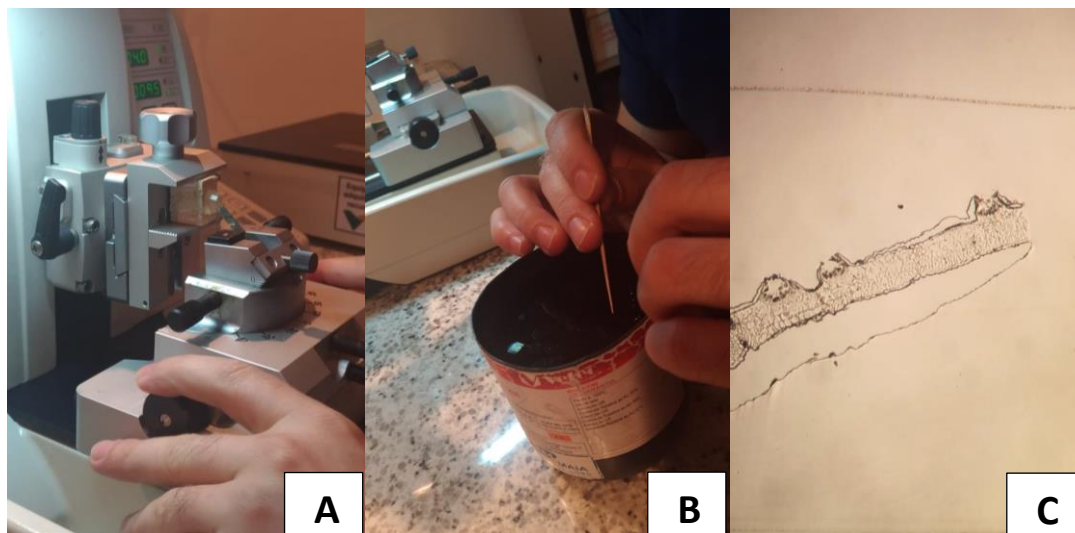
O tempo para que ocorra fixação é variável, dependendo do fixador escolhido, do volume da peça a ser fixada e da resistência da mesma à penetração dos reagentes. Exemplificando, material delicado, como folhas membranáceas, pode ser fixado em 12h, enquanto que ramos lenhosos podem necessitar de 7 dias. Depois de fixado, o material é estocado em solução de etanol a 70% indefinidamente (CAPUTO et al, 2010).

A desidratação remove a água dos tecidos fixados e endurecidos, para que a matriz possa penetrar nas células e tornar o material resistente ao impacto do micrótomo. O método de desidratação mais comum emprega série etanólica, onde o material passa sucessivamente por soluções cada vez mais concentradas de etanol (50, 70, 90, e 100%), por um tempo determinado (CAPUTO et al, 2010).

Mesmo após a fixação e a desidratação, as amostras de tecido são ainda muito frágeis. Acontece então a impregnação do tecido com uma substância de consistência firme. Assim o tecido é endurecido, o que facilita o corte em camadas finas. O material é colocado em um molde (caixinha de papel ou de plástico), que é preenchido pela matriz (parafina ou resina) de modo a formar um pequeno bloco. Este é aparado e pode ser encaixado no micrótomo para ser seccionado. O bloco devidamente aparado é colocado

sobre suporte, fixado no micrótomo e seccionado. A fita formada ou os cortes individuais são apoiados em fundo escuro para facilitar a visualização (CAPUTO et al, 2010).

Durante o período de estágio, foi realizado o acompanhamento de microtomia de tecidos foliares de plantas de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e plantas não inoculadas (Figura 13). Fragmentos de folíolos foram cortados com auxílio de lâmina e o tecido foi preparado através da fixação com formaldeído. Em seguida foi, o material foi desidratado e emblocado com resina. O bloco foi acoplado ao micrótomo manual e foram feitos cortes de 4 µm. Os cortes foram colocados em uma pequena bandeja escura, com água destilada e álcool, para facilitar a “abertura” do corte e sua fixação na lâmina.



**Figura 13.** Microtomia de tecido foliar de soja (A) e corte transversal de folíolo com ferrugem asiática da soja (C).

Os cortes foram dispostos em lâminas. Posteriormente, as lâminas foram levadas para chapas aquecidas a 60 °C, para sua fixação e secagem. No dia seguinte, procedeu-se à coloração dos cortes com o corante azul de toluidina (o tempo de contato com o corante varia de acordo com sua concentração e com o tipo de tecido. Para isso, foram feitos testes com objetivo de encontrar melhor concentração do corante e o tempo de contato). Em seguida, as lâminas foram lavadas e aquecidas a 60°C. Por fim, foi adicionada uma substância capaz preservar e conservar os cortes por longos períodos. As lâminas foram protegidas por lamínula, para posterior visualização e análise em microscópio óptico das células e das estruturas do patógeno em processo de infecção no tecido foliar.

## 2.4. Técnicas de microscopia

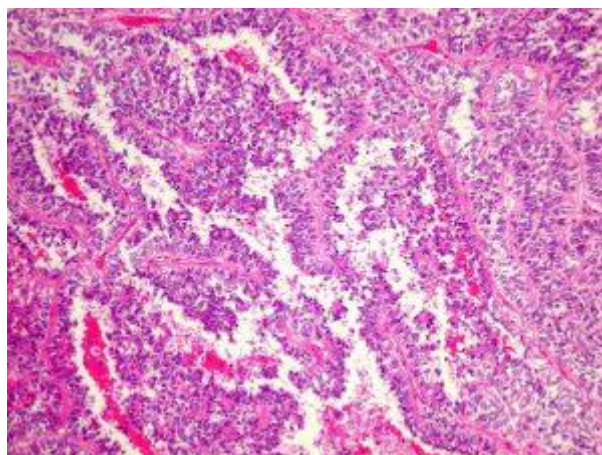
Desde sua invenção há cerca de quatrocentos anos, o microscópio tem desempenhado um papel fundamental na exploração de amostras orgânicas e inorgânicas, tornando-se uma ferramenta indispensável na pesquisa científica. Ao longo deste período, com evolução do conhecimento científico básico em física ótica e a expansão dos campos de aplicação de microscopia nas áreas biológicas e de materiais, tanto no campo da microscopia ótica como na microscopia eletrônica foram desenvolvidos instrumentos

cada vez mais poderosos, uma gama de técnicas de contraste, que aliadas ao surgimento de software e acessórios para processamento e análise de imagem, tornaram a microscopia uma ferramenta imprescindível na ciência moderna (BALDANI, 1998).

Muitas das técnicas microscópicas atualmente aplicadas na compreensão da interação entre plantas e microrganismos foram previamente desenvolvidas para entendimento do processo de infecção e a interação entre planta-patógeno.

Existem várias técnicas e métodos que podem resultar em uma excelente visualização das estruturas celulares e dos patógenos. Alguns métodos observados durante o período de estágio foram a de campo claro, campo escuro, campo de faces, DIC e fluorescência.

Microscopia de campo claro (MOCC) é uma técnica amplamente usada em microscopia, a qual baseia-se na observação de espécimes coradas sob campo de iluminação uniforme. É muito utilizada no campo de anatomia vegetal, para coloração geral ou específica de componentes celulares. Na identificação de bactérias diazotróficas, podemos citar a coloração de gram para separação das bactérias em gram positivas e negativas, método empírico de coloração diferencial que reflete diferenças na constituição da parede celular das bactérias (BALDANI, 1998). A observação de células coradas é necessária para a sua visualização através do MOCC (figura 14). As zonas coradas das células reduzem a amplitude da onda da luz de particular comprimento de onda que passa por ela. Assim, uma imagem colorida é obtida, permitindo a observação das células. Quando se tenta visualizar células não coradas, a onda da luz sofre pequenas alterações de amplitude e os detalhes estruturais não são visíveis, mesmo utilizando uma elevada ampliação. No entanto, a fase da onda é alterada pela passagem pela célula, podem tornar-se visíveis pequenas diferenças (SILVA, 2016)

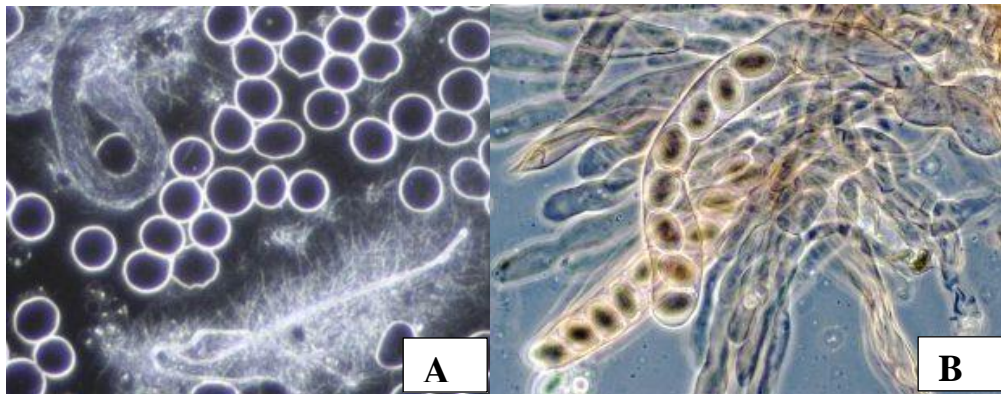


**Figura 14.** Exemplo de microscopia de campo claro. FONTE: kasvi.com.br

Campo escuro e contraste de fase são técnicas óticas de contraste que tem como principal vantagem a possibilidade de observação das preparações *in vivo* com clareza sem a necessidade de fixação e coloração das células, o que poderia trazer alterações morfológicas ao espécime (BALDANI, 1998). O campo escuro (figura 15.A) funciona com base na observação do objeto a partir de luz dispersa, sem luz direta no condensador



do microscópio, produzindo-se um objeto brilhante contra um fundo preto. O olho humano é sensível apenas ao brilho e cor, por isso o campo escuro constitui uma mais valia, por emitir uma imagem contra um campo que intensifica o contraste (VASCONCELOS, 2017). O microscópio de contraste de fase (figura 15.B) é também uma adaptação do óptico e utiliza um sistema de lentes que transforma diferenças de fase em diferenças de intensidade. A luz atravessa diferentes quantidades de matéria, o que gera diferentes índices de refração, ou em outros termos, quanto maior a quantidade de matéria, menor o índice de refração. Porções escuras da imagem correspondem a porções densas do espécime, porções claras da imagem correspondem a porções menos densas do espécime (KASVI, 2017).



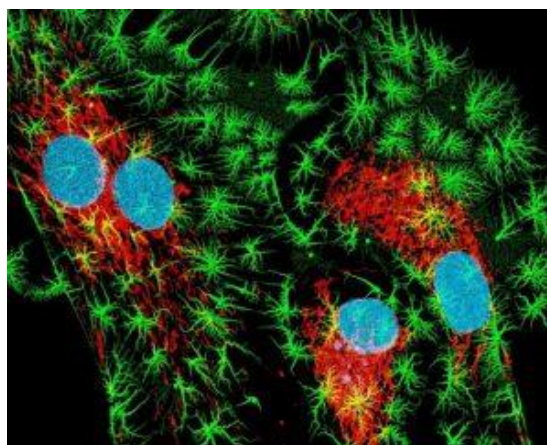
**Figura 15.** Microscopia de campo escuro (A) e microscopia de contraste de fases (B).  
FONTE: kasvi.com.br

O contraste diferencial de interferência (DIC) é uma técnica de contraste de fase que produz imagens com um efeito óptico característico de relevo "3-D" (Figura 16), que permite visualizar estruturas transparentes, explorando as mudanças do índice de refração. Ao contrário da técnica de contraste de fase convencional, que é baseada em mudanças no comprimento do caminho óptico, o DIC é baseado no gradiente de comprimento do caminho óptico (mudança média no comprimento de onda óptico). Gradientes repentinos produzem o alto contraste e o efeito de relevo 3D que é característico do DIC. O contraste nas imagens DIC é produzido exclusivamente através de um efeito óptico. Esta técnica é, portanto, ideal para espécimes vivos não corados (por exemplo, culturas de células, embriões, esfregaços de sangue, diatomáceas, protozoários). O DIC fornece informações morfológicas sem a necessidade de usar corantes e fluoróforos potencialmente tóxicos. No entanto, o DIC é frequentemente usado em associação com fluorescência para revelar características morfológicas do espécime. Também é usado para examinar polímeros e outros materiais (TECNICA EM LABORATORIOS, 2018).



**Figura 16.** Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC). FONTE: kasvi.com.br

A microscopia de fluorescência (figura 17) é uma técnica que baseia-se no uso de corantes fluorescentes ou fluorocromos para visualização do espécime. Estes se ligam a componentes da célula microbiana (p. ex. ácidos nucleicos) e, sob excitação ultravioleta ou radiação eletromagnética na faixa do visível de baixo comprimento de onda, emitem radiação com comprimento de onda superior à radiação incidente. A grande vantagem desta técnica é o ganho de contraste, porém requer custo adicional com aquisição de equipamentos (BALDANI, 1998). Uma molécula com propriedade fluorescente emite luz com comprimento de onda na faixa visível quando exposta a uma fonte ultravioleta (UV). O microscópio de fluorescência usa a capacidade de algumas moléculas em fluorescer sob luz ultravioleta, visualizando moléculas autofluorescentes, como a vitamina A, ou ainda marcando as amostras, com a fluorescência introduzida. A excitação e a emissão de luz das moléculas fluorescentes são reguladas por filtros para promover cor e contraste (KASVI, 2017).



**Figura 17.** Microscopia de fluorescência. FONTE: kasvi.com.br

## 2.5. Troca e preparo de solução nutritiva: sistema hidropônico

O sistema de cultivo em que as plantas são capazes de se desenvolver plenamente sem a utilização do solo é chamado de hidroponia. Neste sistema de cultivo, as plantas se desenvolvem e são alimentadas por meio de uma solução nutritiva, ou seja, em água onde são dissolvidos os sais contendo todos os nutrientes essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento (ALMEIDA, 2016).

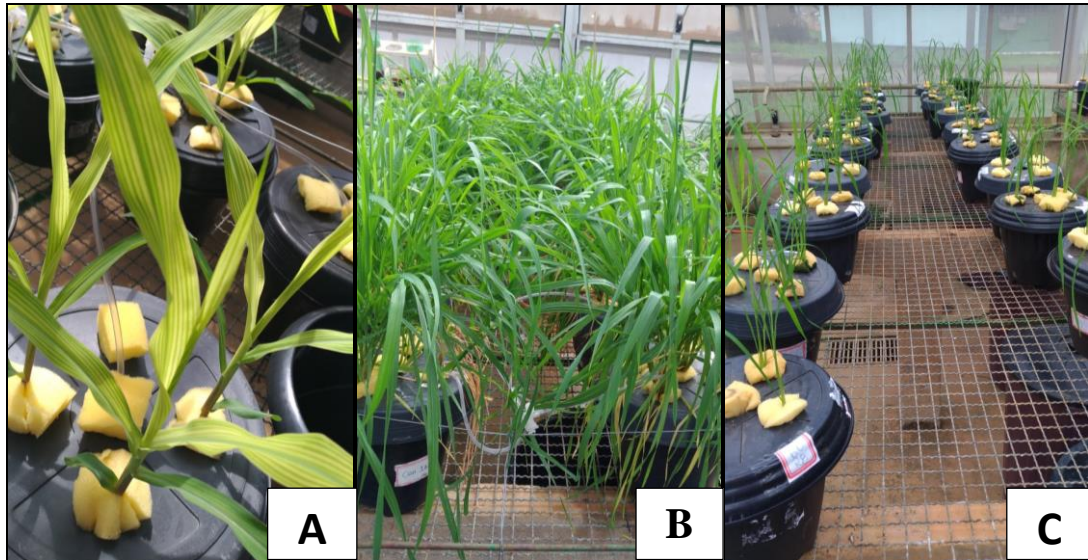
Durante o período de estágio, foi possível acompanhar o sistema hidropônico, que consistia de vasos contendo a solução nutritiva (onde encontravam-se todos os macro e micronutrientes essenciais às plantas). As plantas ainda jovens eram fixadas com auxílio de material esponjoso em tampas específicas para hidroponia (Figura 18 e 19). Os vasos eram aerificados através de um compressor de ar (utilizado apenas para os experimentos com milho, soja e trigo, pois diferentemente de plantas de arroz, estas culturas não possuem aerênquimas em suas raízes, necessitando de um sistema de aeração externo).

Os nutrientes eram dosados de acordo com a necessidade de cada planta. Após o preparo da solução nutritiva, era aferido o pH da mesma, a fim de manter seu pH entre 5,8 e 5,9 (o pH era controlado usando-se ácido clorídrico, para reduzi-lo, caso ele estivesse maior que 5,9 ou utilizando hidróxido de sódio, para elevá-lo, quando o mesmo se apresentava inferior a 5,8). Esta faixa de pH garante melhor eficiência de absorção da maioria dos nutrientes pelas plantas. A solução nutritiva era trocada a cada 5 dias, para evitar contaminação e para repor a água perdida pela transpiração e o pH aferido a cada dois dias. Na tabela abaixo (Tabela 1), encontram-se todos os nutrientes utilizados e suas respectivas doses, para o preparo da solução nutritiva utilizada para o desenvolvimento de plantas de milho.

**Tabela 1.** Nutrientes e doses usados para o preparo de solução nutritiva para milho

Nutrientes	Doses (mL/L)
NH <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2
KNO <sub>3</sub>	2
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5
Mg SO <sub>4</sub>	2
KCl	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Ferro e outros micronutrientes	1

As plantas foram cultivadas em sistema hidropônico para evitar contaminação externa por nutrientes. O objetivo do experimento foi avaliar se determinada concentração de um nutriente, conhecido como indutor de resistência, era realmente eficaz contra o patógeno, e para evitar contaminação por diferentes doses de nutrientes provenientes de substratos. O sistema hidropônico garantia controle da real dose do nutriente em estudo.



**Figura 18.** Plantas de milho (A), trigo (B) e arroz (C), mantidas em sistema hidropônico.

Em milho e soja, os pesquisadores buscavam comprovar a eficiência do níquel contra as doenças (cercosporiose e ferrugem asiática, respectivamente). Em trigo, o experimento consistiu no estudo da interação de silício, cálcio e magnésio, bem como no controle da brusone através desses minerais. Por fim, no ensaio com arroz, o objetivo foi estudar diferentes doses de potássio e o controle da mancha parda na cultura. Apesar de não acompanhar todos os experimentos e o progresso da doença, em alguns ensaios foi possível observar, visualmente, que as plantas tratadas com esses elementos minerais apresentaram menor suscetibilidade ao ataque e infecção dos patógenos.



**Figura 19.** Montagem de sistema hidropônico para plantas de soja.

## 2.6. Testes bioquímicos

Quando atacadas por microrganismos, as plantas lançam mão de artifícios e mecanismos de defesa, através da síntese e atividade de moléculas capazes de agirem sobre o patógeno, impedindo seu desenvolvimento e/ou infecção em seus tecidos. Dentre os mecanismos de defesa, podemos destacar os bioquímicos, que são reações que ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias que são tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o seu crescimento no interior da planta. Algumas substâncias são sintetizadas nas plantas ou ocorre o aumento de sua atividade após o ataque. Dentre essas substâncias, podemos destacar a catalase, enzima do sistema antioxidante da planta, capaz de decompor o peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio capaz de promover danos as células da planta. Outras moléculas capazes de agir diretamente sobre o patógeno são as quitinases e glucanases, que causam lise celular em fungos, uma vez que a parede celular da grande maioria dos fungos é formada por quitina e glucana. Outros compostos importantes na defesa de plantas a fitopatógenos são os compostos fenólicos, pois possuem ação antimicrobiana, e a lignina, responsável pela proteção mecânica do tecido, evitando ou dificultando a penetração dos microrganismos.

### 2.6.1. Quantificação de proteínas totais: método de Bradford

Para os testes bioquímicos, foram utilizadas plantas de arroz inoculadas *Bipolaris oryzae* e plantas sem inoculação, todas tratadas com silício por meio de adubação. As folhas foram coletadas e fragmentadas, mantidas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer até o momento das análises. O material foi pesado em microtubos e macerados em moinho vibratório. Este equipamento garante uniformidade de maceração, diminui os riscos do descongelamento e diminui o tempo e mão-de-obra.

Em seguida, foi acrescentada solução tampão, que age impedindo a degradação da enzima de interesse. Posteriormente, a solução foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outro tubo. Procedeu-se ao preparo da curva teste. Para isso, foram acrescentados em microplacas água deionizada, BSA (proteína usada como padrão) e o corante/reagente Comassie-blue. As microplacas foram agitadas, para evitar bolhas que podem causar erros de leitura, e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

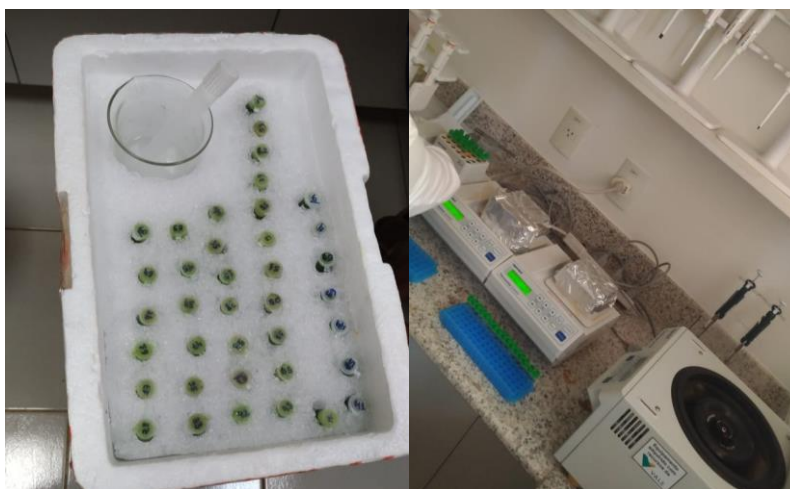


**Figura 20.** Processo de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Espectrofotômetro é um aparelho amplamente utilizado em laboratórios, cuja função é a de medir e comparar a quantidade de luz (energia radiante) absorvida por uma determinada solução. Ou seja, é usado para medir (identificar e determinar) a concentração de substâncias que absorvem energia radiante em um solvente. Este aparelho possui uma gama de aplicações e está presente em várias áreas, tais como em química, física, bioquímica e biologia molecular. A espectrofotometria possibilita, portanto, a passagem de um feixe de luz através de uma amostra e, por meio deste processo, realiza a medição exata da intensidade da luz ao atingir o detector (PROLAB, 2014).

### 2.6.2. Quantificação de quitinase e glucanase

Para atividade de quitinases, foi retirada uma alíquota da solução estoque, extraída anteriormente, adicionado acetato de sódio, com pH 5,2 e acrescentado o substrato específico para quitinase. Para isso, foram usadas microplacas com 64 poços, onde se inseriam as amostras, que foram incubadas a 35°C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico (HCl), para causar a paralisação do processo. Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas, para proceder com a leitura em espectrofotômetro a 492 nm.



**Figura 21.** Processo de extração e quantificação de quitinases e glucanases.

A atividade de beta-1,3-glucanases foi medida seguindo método análogo, apenas com a troca do substrato específico para essa enzima. A leitura em espectrofotômetro também diferiu, sendo realizada com a faixa de absorbância de 620 nm.

### 2.6.3. Quantificação de compostos fenólicos e lignina

Para quantificação de compostos fenólicos, o extrato macerado foi seco em estufa. Em seguida, acrescentou-se metanol 80% e a mistura foi mantida sob agitação por 24 horas. Posteriormente, foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outro microtubo, preservando-se o pellet, para ser usado na quantificação da lignina. Os compostos fenólicos totais foram determinados pipetando-se o extrato metanólico, proveniente da determinação de lignina, misturando-se o reagente específico e mantido em temperatura ambiente por 5 min, adicionando-se então carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sendo homogeneizado e mantido por 10 min em temperatura ambiente. A mistura foi então homogeneizada com 1 mL de água destilada e deionizada e mantida a temperatura ambiente por uma hora. A absorbância da reação foi lida a 725 nm.



**Figura 22.** Processo de quantificação de compostos fenólicos e lignina.

O resíduo foi utilizado para quantificação de lignina. Para tanto, um volume de 1,5 mL da água destilada foi adicionado ao precipitado, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C. Um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl foi adicionado ao resíduo. Os tubos foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e então colocados em banho-maria a 100 °C por 4 h. Após esse tempo, os tubos foram mantidos em gelo por 10 min e centrifugados, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada deionizada e novamente centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 1,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH), sendo a mistura agitada em agitador rotativo em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo adicionado HCl concentrado ao sobrenadante e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 h para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A mistura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado resuspenso em 2 mL de NaOH. A absorbância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em mg de lignina por g de tecido seco.

### 2.6.4. Quantificação de catalase

Para sua quantificação, foram usadas microplacas, onde foram pipetados água deionizada e esterilizada, em seguida o tampão fosfato de potássio (este foi aquecido a 28°C, já que estava resfriado, e a elevação da temperatura favorece a atividade da

enzimática). Logo em seguida, foram adicionadas as amostras e o substrato peróxido de hidrogênio. Posteriormente, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 240 nm. Neste caso, foi possível observar, através dos gráficos gerados pelo programa, que as plantas inoculadas com *Bipolaris oryzae* apresentavam maior atividade da catalase, indicando que esta enzima se encontrava em maior concentração em plantas atacadas, como resposta ao estresse oxidativo acarretado pelo ataque do patógeno.



**Figura 23.** Processo de extração e quantificação de catalase.



### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Durante o período de estágio, foi vivenciado o desenvolvimento de pesquisas envolvidas na indução de resistência de plantas através da nutrição mineral, técnicas e ferramentas para análise de estresses acarretados por organismos patogênicos, bem como o aprendizado e noções sobre a interação entre hospedeiro e patógeno em diversas culturas de importância econômica para o Brasil.

A preocupação com o uso indiscriminado de produtos fitossanitários tem sido motivo para busca de métodos menos invasivos e impactantes ao meio ambiente, além dos gastos voluptuosos no manejo químico das doenças. Dessa maneira, a indução de resistência, através da correta e balanceada nutrição mineral, vem ganhando espaço e destaque na pesquisa. As pesquisas voltadas à interação entre plantas e patógenos são muito importantes para o entendimento dos mecanismos de ataque dos microrganismos causadores de doenças e os mecanismos de defesa de suas respectivas plantas hospedeiras, pois os mecanismos de defesa ainda não são totalmente conhecidos.

A ampliação do conhecimento nessa área vem proporcionando maior domínio nas técnicas bioquímicas, moleculares e fisiológicas, a fim de elucidar as reações celulares e fisiológicas recorrentes de processos infecciosos. Com base em toda a abordagem realizada, é evidente afirmar que o estágio supervisionado é fundamental para a atuação na prática de todo conhecimento adquirido durante a graduação. Vivenciar o desenvolvimento de atividades cotidianas durante o período de estágio foi uma experiência extremamente significativa para a minha formação e meu crescimento profissional e pessoal.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2004.
- ALMEIDA, P. C. Diferentes métodos de cultivo hidropônicos e seus manejo. XI encontro e III simpósio de hidroponia. Florianópolis, SC, 2016.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. D. A. Ferrugem Asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira. Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (*INFOTECA-E*), 2002.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany. Oxford, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.
- BALDANI, V. L. D. et al. Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais. Embrapa Agrobiologia-Documentos (*INFOTECA-E*), 1998.
- BASSO, C.; SUZUKI, A. Solos e nutrição. In: EPAGRI (Ed.). Nashi, a pêra japonesa. Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. cap.4, p.139-160
- BONATO, C. M. et al. Nutrição mineral de plantas. Maringá: Universidade Estadual do Maringá. 1998.
- BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008.
- BROWN, P. H. et al. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. Plant Physiology, v.85, n.3, p. 801- 803, 1987.
- BUIR, R.; PAUZER, J.; TULLIS, E. C. The interrelationship of nitrogen and other factors affecting the blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*. Plant Disease Reporter, Saint Paul, v. 43, p. 477-482, 1959.
- CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas, 2001.
- CAPUTO, L. F. G. et al. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, 2010.
- CARVALHO, L. Taxa de Fotossíntese e Problemas. 2014.
- CASTANO, J. J.; KERNKAMP, M. F. The influence of certain plant nutrients on infection of soybeans by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, Saint Paul, v. 46, p. 326-328, 1956.
- CHAVES, V. V. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA “a” EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR INFESTADOS POR CIGARRINHA-DAS-RAÍZES *Mahanarva fimbriolata*. Viçosa, MG, 2015.

- COLHOUM, J. Effects of environmental factors on plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 11, p. 343 – 364, 1973.
- COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n. 2, 2007.
- DATNOFF, L. E.; RODRIGUES, F. A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and Plant Nutrition. In: DATNOFF L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. Mineral nutrition and plant disease. Saint Paul MN. APS Press, pp. 233-246. 2007.
- DEBONA, D. et al. Calcium-triggered accumulation of defense-related transcripts enhances wheat resistance to leaf blast. *Tropical Plant Pathology*, v. 42, p. 309-314, 2017.
- DURBIN, R.D. The mechanisms for self-protection against bacterial phytotoxins. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 26, p. 313-329, 1988.
- FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. 2005.
- FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Relationship between panicle blast severity and mineral content of plant tissue in upland rice. *Journal of Plant Nutrition*, Monticello, v. 21, p. 1577-1587, 1998.
- FRY, W.E. Principles of plant disease management. San Diego: Academic Press, 1982, 378p.
- GRAHAM, R. D.; WELCH, R. M.; WALKER, C. D. A role for nickel in the resistance of plants to rust. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE, 1985.
- GREE, G. Epidemiology of coffee leaf rust in the Eastern Highlands. *Newsletter - Coffee - Research - Institute* 2:16-20. 1993.
- HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- HERMANS, C.; VERBRUGGEN, N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, v. 56, n. 418, p. 2153-2161, 2005.
- HUBER, D; RÖMHELD, V; WEINMANN, M. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. In: Marschner P (Eds.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Third edition. New York: Academic Press (Elsevier), 2012.
- JIAO, D.; JI, B.; LI, X. Characteristics of chlorophyll fluorescence and membranelipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. *Photosynthetica*, v.41. n.1, p.33-41, 2003.
- KASVI. Disponível em: < <https://kasvi.com.br/microscopio-tecnicas-microscopia/>>. Acesso em 03/01/2019.
- KRAUSE, H.; WEIS, E. *Annual Review Plant Physiology*. 42: 313. 1994.
- LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v.49, p.21-31, 1996.

- LOPES, C., Enzimas – Pathologika. Available, disponível em: <<https://pathologika.com/imuno-histoquimica/marcadores-e-cromogenios/enzimas/>>. Acesso em 03/01/2019.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 2008.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2. ed. New York : Academic, 1995.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. New York: Academic press, 2012.
- MASCARENHAS, H. A. A. et al. Efeito da adubação potássica no cancro da haste da soja. Summa Phytopathologica, Jabotibal, v. 23, p. 217- 221, 1997.
- MCGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Reduced severity of Erwinia soft rot in potato tuber with increase calcium content. Phytopathology, Saint Paul, v. 74, p. 1250- 1256, 1984.
- MITANI, N; MA, JF. Uptake system of silicon in different plant species. Journal of Experimental Botany, 2005.
- NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. Summa Phytopathologica. v.21, p.95-99, 1995.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopatology. v.30, p.369-389, 1992.
- PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In.: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo: Revisão anual de patologia de plantas, 1994.
- PEREIRA, S. C. et al. Effect of foliar silicon application on resistance against coffee leaf rust and on the potentiation of defense enzymes in coffee. Tropical Plant Pathology, v. 34, n. 4, p. 223-230, 2009.
- Portal UFV, disponível em: <<https://www.ufv.br/a-ufv/a-ufv-historia/>>. Acesso em 05/01/2019.
- RODRIGUES, F. A. et al. Pyricularia oryzae-wheat interaction: physiological changes and disease management using mineral nutrition and fungicides. Tropical Plant Pathology, v. 42, p. 223-229, 2017.
- ROUSSEAU, C. et al. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. Plant Methods 9:17, 2013.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008.
- SILVA, M. Microscópio Ótico de Campo Claro, disponível em: <<http://knoow.net/cienterravida/biologia/microscopio-otico-de-campo-claro/>>. Acesso em 05/01/2019.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2003. p.1- 3. (Circular Técnica IPEF, 200).

SINCLAIR, J.B.; HARTAMAN, G.L. Soybean rust. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (Eds.). Compendium of soybean diseases. 4. ed. Saint Paul MN, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. Mineral nutrition. In: TAIZ, L.; ZIEGER, E. Plant physiology. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991.

TECNICA EM LABORATORIOS S. A. Disponível em: <[http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info\\_dic.htm](http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_dic.htm)>. Acesso em 05/01/2019.

TEIXEIRA, R. A. Mecanismos de resistência a fitodoenças. Goiânia, 2011.

VASCONCELOS, A. Microscopia de Campo Escuro: estudo da morfologia das células sanguíneas em sangue vivo, disponível em: <<https://www.atlasdasauade.pt/publico/content/microscopia-de-campo-escuro-estudo-da-morfologia-das-celulas-sanguineas-em-sangue>>. Acesso em 05/01/2019.

VIDHYSEKARAN, P. Physiology of disease resistance in plants. Vol. I. Florida, CRC Press, 1988.

VON ELBE, J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799, 2000.

YAMADA, T. RESISTENCIA DE PLANTAS AS PRAGAS E DOENÇAS: pode ser afetada pelo manejo da cultura?. Piracicaba: Informações Agronômicas, Potafós, v. 1, n. 108, p. 1-7, 2004.

YORINORI, J.T. et al. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Disease, 2005.

YUSUF, M. A. et al. Overexpression of  $\gamma$ -totoopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdã, v. 1797, p. 1428- 1438, 2010.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.) Controle de doenças de plantas. Viçosa, Minas Gerais. Suprema Gráfica e Editora. 1997.