



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE E PRATA SOBRE AS ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HÍDRICO, INFECÇÃO DE *Bipolaris oryzae* E FEIJÃO-CAUPI
SUBMETIDO AO ESTRESSE PELA INFECÇÃO DO *Fusarium oxysporum* f. sp.
tracheiphilum.**

RODRIGO ALBUQUERQUE LÔBO

**RECIFE
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

RODRIGO ALBUQUERQUE LÔBO

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE E PRATA SOBRE AS ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HÍDRICO, INFECÇÃO DE *Bipolaris oryzae* E FEIJÃO-CAUPI
SUBMETIDO AO ESTRESSE PELA INFECÇÃO DO *Fusarium oxysporum f. sp.*
tracheiphilum.**

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

Relatório de estágio supervisionado
obrigatório apresentado à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco (UFRPE), para
obtenção de graduação no curso de
Agronomia, sob orientação do Prof.
Dr. Jonas Alberto Rios.

**RECIFE
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

RODRIGO ALBUQUERQUE LÔBO

EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE E PRATA SOBRE AS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO E INFECÇÃO DE *Bipolaris oryzae* E FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDO AO ESTRESSE PELA INFECÇÃO DO *Fusarium oxysporum f. sp. Tracheiphilum*.

Discente: Rodrigo Albuquerque Lôbo

Curso: Agronomia

CPF: 117.978.394-89

Tipo de Estágio: Estágio Supervisionado Obrigatório Área de **Conhecimento:** Fitopatologia

Local do Estágio: Laboratório de Resistência genética da Fitossanidade/fitopatologia UFRPE/SEDE

Setor: Resistência genética de doenças de plantas

Supervisor: Dr. Jonas Alberto Rios (Coordenador do Projeto)

Professor Orientador: Dr. Jonas Alberto Rios

Período de realização: 01/10/2021 a 23/11/2021

Carga horária: 210 horas

RECIFE
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

ESTAGIÁRIO NÍVEL SUPERIOR - AGRONOMIA

AVALIAÇÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO:

NOTA: Nove vírgula cinco (9,5)

Discente:

Rodrigo Albuquerque Lôbo
Graduando em Agronomia
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE)

Orientador:

Prof Dr. Jonas Alberto Rios
(Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE)

Coordenador do curso de Agronomia:

Prof Dr. Álvaro Carlos Goncalves Neto
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE)

RECIFE
2021

AGRADECIMENTOS

Durante toda a minha jornada na graduação algumas pessoas me ajudaram e me incentivaram para que eu nunca desistisse, mas gostaria de começar esse agradecimento dedicando, primeiramente, a mim mesmo que nunca me deixei desistir e que sempre fui forte o suficiente pra suportar toda a realidade de um universitário. Nunca nem cogitei em desistir e sempre corri atrás dos meus objetivos e, tenho certeza que o Lobo, aquele garoto do 1º período que pensava que não conseguiria, teria muito orgulho de conhecer esse Lobo que está se formando e com o pé no mestrado.

À minha família que é minha base e sustento.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo privilegio de me permitir fazer parte dessa instituição. Toda a equipe técnica, administrativa, docentes, e de serviços gerais.

Aos meus amigos universitários que fizeram os momentos serem mais leves. Agradeço em especifico a Carina Taraves e Joanne Ferreira que são duas amigas que vou levar pra vida. Agradeço em especial ao meu amigo Rayhonay Souza que, durante a pandemia, esteve sempre comigo e não soltou minha mão, mesmo nos piores momentos.

Ao professor Dr. Alessandro Nicoli pela orientação, paciência e suporte que me forneceu quando eu ainda era um calouro. Sou infinitamente grato

Ao professor Dr. Jonas Alberto Rios pela orientação, apoio e incentivo que me forneceu durante minha graduação.

Às doutorandas Cassia da Hora e Larissa Almeida que tive o prazer de acompanhar durante suas caminhadas de mestrado e doutorado e recebi bastante experiência.

Aos meus amigos de vida que são os meus companheiros e que fazem minha vida sempre mais alegre com as nossas brincadeiras, encontros e festas.

RECIFE
2021

Aos meus amigos virtuais e estrangeiros que talvez a gente nunca se encontre, mas que eu tenho um carinho enorme. Estão comigo diariamente jogando algum jogo, estudando algo juntos ou apenas me ouvindo reclamar do calor da minha cidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Edifício Octávio Gomes. UFRPE FITOSSANIDADE.....	12
Figura 2 - Crescimento de fungo em placa de petri.....	15
Figura 3 - Feijão-caupi em copos descartáveis.....	17
Figura 4 - Preparação dos vasos de 3l para transplatio	17
Figura 5 - Plantas após o transplatio e tutoradas	18
Figura 6 - Emergência da vagem após emasculação e cruzamento genético	19
Figura 7 - Análise das raízes do feijão-caupi após a inoculação com o patógeno	21
Figura 8 - Correção do pH para as soluções de nanopartículas.....	23
Figura 9 - Almofariz e pistilo com material fracionado e hidrogênio líquido.....	25
Figura 10 - Microtubo para centrífuga com material cloroplastídicos extraído por maceração	25
Figura 11 - Microtubos armazenados em recipientes com gelo	26

SUMÁRIO

1 RESUMO	9
2 INTRODUÇÃO.....	10
3 OBJETIVO	11
3.1 Geral	11
3.2 Específico	11
4 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO.....	12
5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	12
5.1 Procedimentos em Laboratório.....	13
5.1.1 Preparo de meio de cultura	13
5.1.2 Autoclavagem.....	13
5.1.3 Flambagem	13
5.1.4 Preparo de Lâminas microbiológicas	14
5.1.5 Preparo do Álcool 70%.....	14
5.1.6 Preparo do Hipoclorito de Sódio 1%	15
5.1.7 Reprodução e crescimento de fungos e repicagem.....	15
5.1.8 Esterilização das Placas de Petri.....	15
5.1.9 Descarte de Material contaminado	16
5.2 Procedimentos em campo (Casa de vegetação).....	16
5.2.1 Plantios	16
5.2.2 Coleta das Flores do feijão	18
5.2.3 Cruzamento Genético	18
5.3 Atividades desenvolvidas para o experimento “Aspectos bioquímicos e fisiológicos do feijão-caupi infectados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Tracheiphilum</i> ”	19
5.3.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento	20

5.3.2 Procedimento de inoculação	20
5.3.3 Avaliação da intensidade da doença	22
5.3.4 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	22
5.3.4 Aplicação de nanopartículas de prata (Ag) e cobre (CU).....	22
5.4 Atividades desenvolvidas para o experimento “Efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico e infecção de <i>Bipolaris oryzae</i> ”	23
5.4.1 Sistema de cultivo.....	23
5.4.2 Preparo da solução nutritiva e crescimento	24
5.4.3 Inoculação por pulverização e Aplicação de nanopartículas.....	24
5.4.4 Análise de teor de pigmentos cloroplastídicos	24
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28

1 RESUMO

As Nanopartículas vêm se mostrando como um produto bastante versátil, podendo ser utilizadas como nanofertilizantes ou nanocidas. Na fitopatologia, a aplicação da nanotecnologia ainda é algo, relativamente, recente e que vem, através de estudos, desenvolvendo novos produtos com características fungicidas, viricidas, bactericidas e nematicidas. Além disso, os nanomateriais de maior uso para controle de fitopatógenos fúngicos são aqueles compostos por prata, zinco, carbono e cobre. O presente relatório é uma descrição das atividades laboratoriais e de campo, onde foram desenvolvidos e acompanhados dois experimentos distintos, analisando os efeitos de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico e infecção de *Bipolaris oryzae* e feijão-caupi submetido ao estresse pela infecção do *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*. O estágio teve como objetivo o desenvolvimento em técnicas laboratoriais e de campo, direcionada a área de fitossanidade, através do acompanhamento de experimentos direcionados a resistência genética de plantas a doenças.

Palavras-chave: Fitopatologia, nanopartículas, resistência, patógeno.

2 INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia é definida como o estudo dos fenômenos de estruturas que possuem uma dimensão em nanoescala, definida na faixa entre 1nm – 100 nm, normalmente não excedendo essa faixa definida pela escala manométrica (Sahoo et al., 2007).

No setor agrônômico, as nanopartículas vêm se mostrando como um produto bastante versátil, podendo ser utilizadas como nanofertilizantes ou nanocidas (FURLANETO, 2011) e de acordo com DUHAN et al., 2017, a Nanotecnologia está em um avanço constante, sobre estudo de sua aplicação na agricultura e vem contribuindo de maneira promissora para o agronegócio.

Na fitopatologia, a aplicação da nanotecnologia ainda é algo, relativamente, recente e que vem, através de estudos, desenvolvendo novos produtos com características fungicidas, viricidas, bactericidas e nematicidas. Além disso, os nanomateriais de maior uso para controle de fitopatógenos fúngicos são aqueles compostos por prata, zinco, carbono e cobre (ÁLVAREZ-LÓPEZ et al., 2016).

O arroz, cultura originária da Ásia, é um dos cereais mais produzidos no mundo e se destaca como o principal alimento mais consumido pela metade da população mundial (FAO, 2004; CONAB, 2015). A mancha-parda, doença causada pelo patógeno *Bipolaris oryzae*. é descrita como a principal patologia do arroz em regiões tropicais (LUDWIG et al., 2009). A sintomatologia dessa doença se caracteriza pelas manchas ovuladas e de coloração marrom-avermelhada que aparecem em toda parte aérea da planta (BEDENDO; PRABHU, 2016).

O Feijão-caupi, cultura originária da África, é uma leguminosa de destaque para o desenvolvimento agrícola, sendo uma cultura protagonista da base alimentar de muitas regiões, gerando renda e emprego, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do Brasil (FILGUEIRA, 2008; NUNES et al., 2014). A murcha do fusarium, doença causada pelo patógeno *F. oxysporum f. sp. tracheiphilum* é uma doença de bastante importância comercial, já que sua severidade acarreta em uma perda de até 98% no rendimento do grão (MICHEREFF, 2003). A sintomatologia dessa doença se dá através da penetração do patógeno no sistema radicular, entupimento dos vasos condutores e, conseqüentemente murcha da planta (POTTORFF et al., 2012).

O presente relatório é uma descrição das atividades laboratoriais e de campo, exercidas na Universidade Federal Rural De Pernambuco, no departamento de Fitossanidade/Fitopatologia, no campus SEDE, onde foram desenvolvidos e acompanhados dois experimentos distintos, analisando os efeitos de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico e infecção de *Bipolaris oryzae* e feijão-caupi submetido ao estresse pela infecção do *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Desenvolvimento em técnicas laboratoriais e de campo, direcionada a área de fitossanidade, através do acompanhamento de experimentos direcionados a resistência genética de plantas a doenças.

3.2 Específico

- Entender, acompanhar e participar da produção bibliográfica sobre efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico e infecção de *bipolaris oryzae*.
- Entender, acompanhar e participar da produção bibliográfica sobre o efeito, efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de feijão-caupi submetidas a infecção de *Fusarium oxysporum f. sp. Tracheiphilum*.

4 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

O estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado durante o período de 01 de outubro a 23 de novembro de 2021, no Laboratório de resistência genética de plantas, do departamento de fitossanidade, Setor de fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

O setor de fitopatologia é um prédio (Fig. 1), composto por 10 laboratórios, onde são realizadas atividades científicas. O departamento também é munido de casas de vegetal para desenvolvimento e acompanhamento dos experimentos. Além de desenvolvimento científico, o prédio também funciona como um departamento educacional, onde alunos da instituição possuem aulas da pós-graduação e desenvolvem atividades práticas das disciplinas.



Figura 1 – Edifício Octávio Gomes. UFRPE FITOSSANIDADE.

Fonte: *Google Maps*

5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante todo o estágio, foi possível o aprendizado de várias atividades laboratoriais e preparação de material para experimentos. Mesmo não havendo atividades para os experimentos científicos diariamente, várias praticas laboratoriais eram feitas e, com isso, absorvi conhecimentos desde de atividades simples até mais complexas.

RECIFE
2021

5.1 Procedimentos em Laboratório

5.1.1 Preparo de meio de cultura

Foi aprendido, em laboratório, o modo de preparo do meio de cultura que é feito, principalmente, com o BDA (Batata, dextrose, Ágar). As etapas do procedimento são: Misturar 40gm de BDA com 1L de água destilada até dissolver totalmente. Levar ao micro-ondas por 1 minuto só para não sobrar resíduo que não dissolveu completamente. Após isso, distribuir o meio para os balões (Erlenmeyer) e vedá-los com algodão, algum papel espesso e ligas elásticas. Esterilizar na autoclave e depois distribuir o meio em placas de petri também esterilizadas. Nunca tirar a vedação fora da câmara de fluxo para não haver contaminação.

5.1.2 Autoclavagem

Nos preparos de meio de cultura ou esterilização de equipamentos e materiais, geralmente foi usado o processo de autoclavagem que funciona assim: Inicialmente deve-se verificar o nível da água no equipamento. Com o objetivo a ser esterilizado já vedado para o procedimento, deve ser colocado dentro da autoclave, em cima de uma divisória metálica. Feche todo o equipamento girando 2 pinos por vez e que estejam em sentidos opostos. Abra a válvula de ar e ligue o equipamento no máximo. Quando começar a ferver, feche a válvula de ar e deixe pegar pressão. Quando atingir 121°C, diminua a potência do equipamento para médio e deixe por mais um tempo recomendado que é cerca de 15 minutos. Após esse tempo, desligue totalmente o equipamento e espere esfriar para depois recolher os materiais e equipamentos. Esse processo utiliza calor úmido sob pressão para esterilizar.

5.1.3 Flambagem

Essa técnica consiste em esterilizar um utensílio metálico colocando-o em contato com fogo. O material é colocado no fogo até que fique vermelho. A coloração indica o nível da temperatura que resulta na esterilização.

5.1.4 Preparo de Lâminas microbiológicas

As lâminas produzidas eram, principalmente, para fazer observação e avaliação dos fungos. O procedimento feito para produção da lâmina foi: Antes de tudo, ter a lâmina, lamínula e o fungo que poderia estar em uma placa de petri, folha, raiz ou outros lugares. Deve-se usar uma agulha para fazer uma leve raspagem ou coleta do fungo e colocá-lo no centro da lâmina. Logo após, pingar um pouco de água para facilitar a visualização e talvez pingar um pouco de corante, caso o fungo tenha uma coloração difícil de visualizar. Depois de pingar, pegue a lamínula e coloque-a sobre a lâmina em pé e apoiada começando bem da margem do centro e desça bem devagar para não ficar bolha d'água. Caso queira armazenar essa lâmina, vede as bordas com esmalte incolor.

5.1.5 Preparo do Álcool 70%

O álcool utilizado para esterilização das mãos e de algumas ferramentas deve ser de 70% álcool e 30% água. O álcool comum para venda é o 96% e por isso, deve-se haver um processo de diluição para transformá-lo em 70%. Para realizar esse procedimento, basta usar uma fórmula básica que é: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

Exemplo para produção de 500ML:

$$C1 = 96\% \quad V1 = ?$$

$$C2 = 70\% \quad V2 = 500\text{ML}$$

V1 é a quantidade em ML de água que vou misturar no álcool 96% para obter 500ML de Álcool a 70%

$$96\% \cdot V1 = 70\% \cdot 500 \quad V1 = \frac{3500}{96} = 364,58\text{ml} - \text{H}_2\text{O}$$

*Misturar 364,58ml de Álcool 96% + 135,41ml de Água destilada para obter 500ml de Álcool 70%

5.1.6 Preparo do Hipoclorito de Sódio 1%

Hipoclorito de Sódio, mais conhecido como água sanitária, é vendido a 2%. Para diluir e deixar em 1% deve-se usar a mesma fórmula do preparo do álcool que é:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Como ele vem em 2% e queremos em 1%, é basicamente misturar a mesma quantidade do hipoclorito de sódio com água destilada. Meio à meio.

5.1.7 Reprodução e crescimento de fungos e repicagem

Para fazer o fungo crescer numa placa de petri, precisa-se do isolado em um eppendorf. Deve-se fazer um pequeno corte na parte superior do meio de cultura que esteja nesse recipiente. Esse corte deve ser em formato de um “V” e logo em seguida colocar esse pedaço numa placa com o meio de cultura já pronto. Vede a placa com papel filme para não haver contaminação. Para fazer repicagem: Com uma placa já com o isolado crescido, use um pedaço de canudo (que já esteja sido esterilizado na autoclave) para fazer discos na placa com o fungo e, posteriormente, passar esse disco para uma nova placa com meio de cultura.

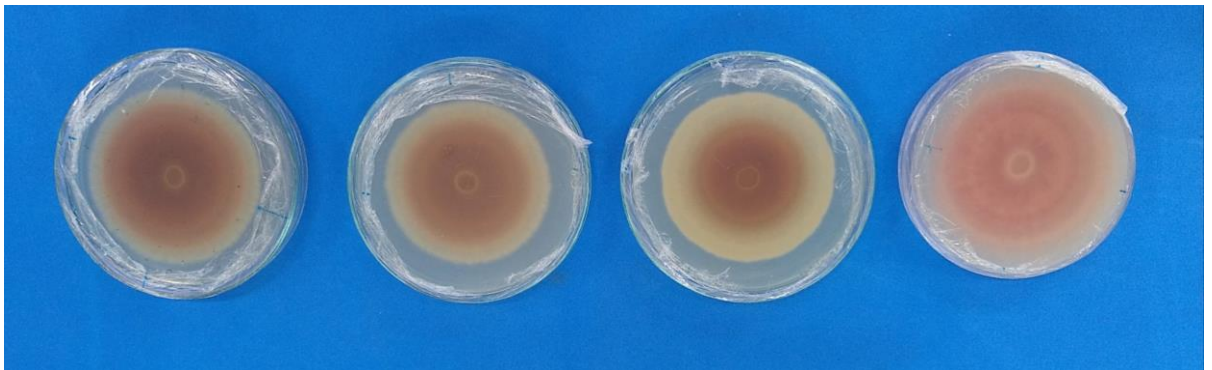


Figura 2 - Crescimento de fungo em placa de petri
Fonte: Coleção pessoal

5.1.8 Esterilização das Placas de Petri

A esterilização das placas deve ser feita a seco, ou seja, usando a estufa. Coloque as placas cobertas de jornal dentro da estufa e marcar em seu termostato 180°C. Quando

atingir essa temperatura, deixe lá por 2 horas. Após esse tempo, abaixar a temperatura para 60°C. Quando atingir, desligue a estufa, mas não abra. A estufa só pode ser aberta quando chegar em 40°C

5.1.9 Descarte de Material contaminado

Para fazer a eliminação correta de meio de cultura contaminado ou com restos do fungo sem serventia, deve-se fazer autoclavagem desse material em uma sacola plástica bem fechada e logo depois jogar no lixo. Não descartar sem essa esterilização, pois o fungo pode contaminar o meio ambiente.

5.2 Procedimentos em campo (Casa de vegetação)

5.2.1 Plantios

Durante todo o estágio, foram feitos vários plantios do feijão-caupi (*vigna unguiculata* (L.) Walp) e foram realizados vários procedimentos para cultivo desse feijão. O primeiro processo foi plantar a semente com embrião voltado pra cima no substrato e em um copo descartável. Após 15 dias se faz o transplante dessa muda para um vaso maior e com solo.



Figura 3 - Feijão-caupi em copos descartáveis
Fonte: Coleção pessoal



Figura 4 - Preparação dos vasos de 3l para transplatio
Fonte: Coleção pessoal



Figura 5 - Plantas após o transplante e tutoradas
Fonte: Coleção pessoal

5.2.2 Coleta das Flores do feijão

O feijão caupi tem o ciclo de florescimento de 45 dias. As flores eram coletadas nesse período e durante o início da manhã porque é o horário que essas flores estão abertas e que servem para ser feito o cruzamento genético.

5.2.3 Cruzamento Genético

O cruzamento genético do feijão caupi foi feito para geração de um híbrido. Foi feito a técnica de hibridização. Essa técnica funciona da seguinte forma: Com as flores do P1 coletadas, era removido todo o pólen da P2 antes de haver a autofecundação e introduzido o pólen da P1 nessa planta. Desta forma, eles gerariam o F1 que seria o híbrido.



Figura 6 - Emergência da vagem após emasculação e cruzamento genético
Fonte: Coleção pessoal

5.3 Atividades desenvolvidas para o experimento “Aspectos bioquímicos e fisiológicos do feijão-caupi infectados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum*”

Para avaliação e identificação de fontes de resistência genética à murcha-de-fusarium, dois genótipos (tratamentos) de feijão-caupi foram utilizados em experimentos realizados em casa de vegetação pertencente a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, Recife (PE). Os genótipos de feijão-caupi foram oriundos da coleção existente no Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA-Recife-PE). Como padrão de suscetibilidade, foi utilizada a cultivar BR-17 Gurguéia e como padrão de resistência os genótipos MNC01-649F-2-1 os quais pertencem a Embrapa Meio-Norte e já foram identificados anteriormente (Noronha et al. 2013). O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados (DIC), dois tratamentos (genótipos), cinco repetições, e as parcelas foram constituídas por vasos de 3 L contendo solo.

5.3.1 Preparo da solução nutritiva e crescimento

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação situada na latitude 8° 1'1.16" S e longitude 34°56'38.70" O, localizada no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DEPA/UFRPE). As plantas foram adubadas com solução nutritiva com a aplicação de 50 mL por vaso 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. Essa mesma solução foi utilizada na segunda e na terceira semana após emergência das plântulas.

5.3.2 Procedimento de inoculação

Um isolado patogênico de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (CMM-732) foi obtido junto à Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof.^a Maria Menezes” – CMM, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Prévios estudos demonstraram que este isolado apresenta alto nível de agressividade (Noronha *et al.* 2013). A produção do inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foi feita por meio do cultivo do isolado CMM-732 em meio de cultura BDA (batata dextrose Agar), e mantidas em câmara de crescimento sob temperatura de 25 °C e luminosidade constante por 7 dias. Após este período, as placas de Petri foram lavadas com 10 mL de água destilada esterilizada e com auxílio de um pincel de cerdas macias foi realizada a raspagem superficial do micélio para liberação dos conídios. Após a filtragem gaze dupla, a concentração da suspensão foi ajustada para 1x10⁶ conídios/mL em câmara de Neubauer.

Na casa de vegetação, as sementes dos genótipos foram semeadas em copos plásticos contendo substrato agrícola e cultivado até a formação do primeiro par de folhas expandidas. Plantas apresentando o primeiro par de folhas primárias foram inoculadas utilizando a metodologia de imersão de raízes em suspensão de conídios (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987). Para isso, estas plantas foram cuidadosamente retiradas dos copinhos e suas raízes lavadas com água destilada. Após a lavagem, as

raízes primárias e secundárias de cada planta tiveram 1/3 o seu ápice cortado. Imediatamente após o corte, o sistema radicular das plantas foi imergido na suspensão de conídios durante 5 minutos. Similarmente, as plantas utilizadas como testemunha tiveram suas raízes similarmente cortadas e imersas por 5 minutos em água destilada e autoclavada. Em seguida, três plantas de cada genótipo foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 dm³ de substrato.

Também foi avaliada a descoloração vascular, cortando o caule verticalmente para verificar a extensão dos sintomas da doença, conforme a figura abaixo (POTTORFF *et al.*, 2012).

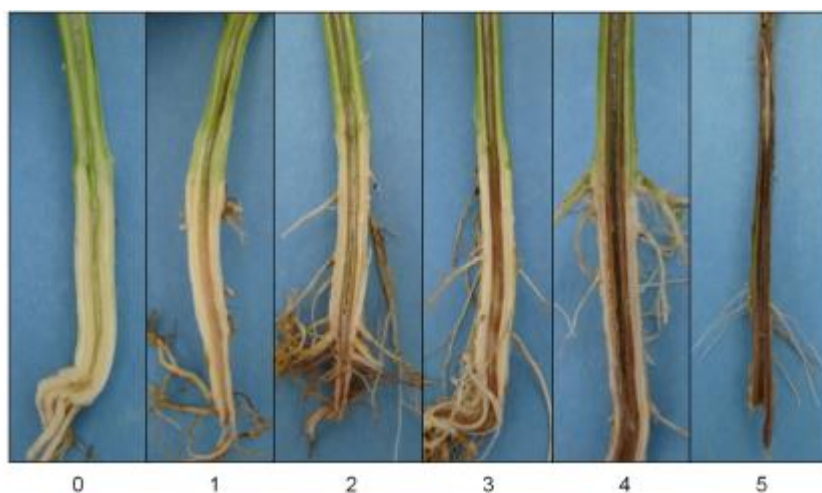


Figura 7 - Análise das raízes do feijão-caupi após a inoculação com o patógeno

Nota 0 = planta sem sintomas da doença; 1 = aproximadamente 10% da planta mostra sintoma da doença; 2 = aproximadamente 25%; 3 = aproximadamente 50%; 4 = aproximadamente 75%; 5 = 100% da planta mostra sintoma da doença.

A determinação do teor de matéria seca das plantas de feijão-caupi (tratamentos) foi de acordo com Souza, (2002):

$$ms(\%) = \frac{(c-a)}{(b-a)} \times 100$$

Ms – matéria seca; A – Peso da bandeja vazia; B – Peso da bandeja após adicionado a planta do feijão-caupi; C– Peso da amostra seca.

5.3.3 Avaliação da intensidade da doença

As avaliações da severidade da murcha de fusarium nas plantas foi realizada aos 7, 11, 15 e 21 dias após a inoculação, com o auxílio de uma escala de notas adaptada de Schoonhoven e Pastor-Corrales 1987, onde: 0 = planta sem sintomas externos; 1 = menos de 10% da folhagem com clorose e/ou murcha; 2 = aproximadamente 25% de folhas com clorose e/ou murcha; 3 = aproximadamente 50% das folhas e ramos com clorose e/ou murcha, com as plantas manifestando nanismo; 4 = aproximadamente 75% ou mais das folhas e ramos com murcha, nanismo severo e desfolha prematura, frequentemente resultando na morte da planta.

5.3.4 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 com (cinco) repetições. Os fatores estudados foram os níveis de resistência (suscetível, moderadamente resistente e resistente) e inoculação de plantas (inoculado e não inoculado). Cada unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo três plantas de feijão. Os dados das análises epidemiológicas, bioquímicas, e fisiológicas foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

5.3.4 Aplicação de nanopartículas de prata (Ag) e cobre (Cu)

Através de um experimento pré realizado in vitro com o *Fusarium oxysporum*, foi definido a dose necessária para aplicação das nanopartículas de prata e cobre. No

feijão caupi, foi feita a inoculação do patógeno e aplicação de forma aérea, através de pulverizações das doses na área folia e pipetagem da dosagem diretamente no solo do vaso ao redor de toda a raiz da planta. Além de cobre e prata, em algumas plantas formam aplicadas dosagens de brion.



Figura 8 - Correção do pH para as soluções de nanopartículas
Fonte: Coleção pessoal

5.4 Atividades desenvolvidas para o experimento “Efeito de nanopartículas de cobre e prata sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico e infecção de *Bipolaris oryzae*”

Para avaliação e identificação dos efeitos de nanopartículas de cobre e prata no arroz à mancha-parda, foram realizados experimentos em casa de vegetação pertencente a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, Recife (PE).

5.4.1 Sistema de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação situada na latitude 8° 1'1.16" S e longitude 34°56'38.70" O, localizada no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DEPA/UFRPE). O arroz foi

conduzido em sistema hidropônico com 3 plantas por vasos complementares cheios de solução nutritiva.

5.4.2 Preparo da solução nutritiva e crescimento

As plantas foram imersas em solução nutritiva com 1000 mL por vaso 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.

5.4.3 Inoculação por pulverização e Aplicação de nanopartículas

Após o fungo ter sido cultivado em placas de petri, foi feita a inoculação nas plantas de arroz através da pulverização com borrifadores. A solução de nanopartículas de prata e cobre também foi pulverizada em alguns tratamentos para se observar o efeito dessas nanopartículas na intensidade de infecção do fungo *Bipolaris oryzae*. As análises dos tratamentos se deram início as 48 horas após a inoculação e se deu por 3 dias.

5.4.4 Análise de teor de pigmentos cloroplastídicos

No experimento, foi feita a análise de pigmentos das plantas de arroz, onde foram coletadas folhas dos tratamentos para se observar a influencia das nanopartículas na infecção do fungo. As eram coletadas, pesadas em 200gramas, fragmentadas e adicionadas em um almofariz para o processo de maceração com o auxílio de um pistilo. Para parar o processo fotossintético, era adicionado hidrogênio líquido que também auxiliava na maceração. Após toda a extração do cloroplasto, o líquido era movido para micro tubos (fig x) e adicionados em recipientes com gelo. Após essas etapas, o material era levado para análise em máquinas de análise pigmentos por fotogrametria



Figura 9 - Almofariz e pistilo com material fracionado e hidrogênio líquido
Fonte: Coleção pessoal



Figura 10 - Microtubo para centrífuga com material cloroplásticos extraído por maceração
Fonte: Coleção pessoal.

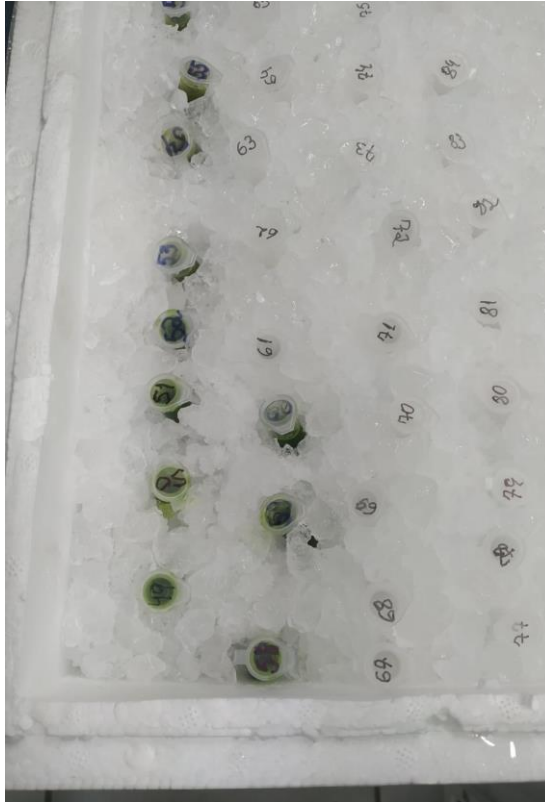


Figura 11 - Microtubos armazenados em recipientes com gelo
Fonte: Coleção pessoal

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) cumpriu todo seu objetivo me fazendo ter conhecimentos e habilidades práticas. Me proporcionou colocar em prática e reter melhor todo o conhecimento adquirido em sala de aula com a prática no laboratório e também no campo. Trouxe conhecimento de técnicas que, possivelmente, serão utilizadas para futuros projetos acadêmicos.

Nas atividades laboratoriais e de campo, fui sempre bem acompanhado e supervisionado quando necessitava realizar o manuseio de substâncias as quais nunca tinha trabalhado antes. Algumas atividades demandavam mais de uma pessoa para elaboração e eu estava sempre acompanhado e auxiliando nessas atividades. Para as análises realizadas, todo o equipamento era, detalhadamente, apresentado a mim e pude aprender todo o funcionamento e manuseio das máquinas.

Por questões morfológicas e fisiológicas das plantas, algumas atividades dos experimentos não poderiam ser realizadas em qualquer horário e, por isso, a permanência no local de estágio era estendida, mas todo conhecimento adquirido fez valer todo o tempo dedicado.

Infelizmente, a iniciação do meu estágio se deu em um período onde os experimentos que eu acompanhei já estavam em seu estágio final e algumas atividades eu não pude realizar, mas lendo toda a metodologia, pode-se entender o que foi feito e o que precisava fazer para a finalização do experimento.

O laboratório não é munido de todo o equipamento necessário para as análises exigidas para os experimentos e, por isso, muitas vezes era necessário o deslocamento para outros laboratórios para realização de análises específicas.

Por fim, afirmo que todas as 210 horas de estágio realizadas foram de bastante produtividade e pude absorver muita experiência. Acompanhei a produção de duas teses de doutorado e que serão publicadas como artigos científicos.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-LÓPEZ, V., PRIETO-FERNÁNDEZ, Á., CABELLO-CONEJO, M. I., e KIDD, P. S. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. *Science of the total environment*, v. 548, p. 370-379, 2016.

ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Influência da intensidade da murcha de fusário no rendimento do caupi. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, v. 28, n. 2, p. 615– 619, 2003b.

BEDENDO, I.P; PRABHU, A.S. Doenças do Arroz. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. v.2. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016, p.87-99.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *A cultura do arroz / organizador Aroldo Antonio de Oliveira Neto*. – Brasília: Conab, 2015. 180 p. Disponível também em: <http://www.conab.gov.br> ISBN: 978-85-62223-06-8 1. Arroz - Brasil. I. Título.

DUHAN, J. S., KUMAR, R., KUMAR, N., KAUR, P., NEHRA, K., & DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, v. 15, p. 11-23, 2017.

FILGUEIRA, F.A.R. *Novo manual de olericultura*. Viçosa: UFV. 2008. 421 p

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. *Revista Pesquisa & Tecnologia*, v. 8, n. 2, 2011.

LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S.S.; RIBEIRO, A.S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. *Tropical Plant Pathology, Brasília*, v.34, n.5, p.322-328, 2009.

NORONHA, M. A. *et al.* Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, Recife-PE, 2013. p. 3.

NUNES, H. F.; FILHO, F.R.F.; RIBEIRO, V.Q.; GOMES, R.L. F. Grain yield adaptability and stability of blackeyed cowpea genotypes under rainfed agriculture in Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, v.9, p.255-261, 2014

Pottorff M, Wanamaker S, Ma YQ, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ (2012) Genetic and physical mapping of candidate genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *PLoS ONE* 7:1-12.

SAHOO SK, PARVEEN S, PANDA J.J. O presente e o futuro da nanotecnologia: *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1): 20-31, 2007.