



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia
sclerotiorum***

Beatriz Souza Damasceno

Recife – PE

2023

Beatriz Souza Damasceno

Efeito de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

Recife – PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D155e Damasceno, Beatriz Souza
 Efeito de nanopartículas de prata em folhas de tomateiro inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* / Beatriz Souza
 Damasceno. - 2023.
 49 f. : il.
- Orientador: Jonas Alberto Rios.
 Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
 Recife, 2023.
1. Sistema antioxidante. 2. estresse biótico. 3. *solanum lycopersicum*. 4. tomate. I. Rios, Jonas Alberto, orient. II. Título

CDD 632

Efeito de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

BEATRIZ SOUZA DAMASCENO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 20/07/2023

ORIENTADOR(A):

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Humberson Rocha Silva

Prof^a. Dr^a. Camila Cristina Lage de Andrade

Recife – PE

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar até aqui.

A minha família por todo o apoio, em especial aos meus irmãos Izael, Ismael e Israel. Aos meus pais, Gilberto Damasceno (*in memorian*) e Djanira Souza Damasceno (*in memorian*).

A minha amiga Welica, pela parceria e por se fazer sempre presente. Aos colegas que fizeram parte dessa jornada, Luciana, Ingrid, Roselane, André, Ana Flávia, Larissa, Walter, Erasmo e Suzypor cada momento compartilhado (abandonada jamais).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF) por todo conhecimento transmitido ao longo destes dois anos.

Ao Professor Jonas Rios pela orientação, ensinamentos e compreensão ao longo desse período.

Ao Sr. Luís da casa-de-vegetação e Adelmo pela atenção e toda ajuda na realização dos experimentos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

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

A Professora Thaís Ribeiro Santiago, da Universidade de Brasília (UNB), pelo preparo e envio das Nanopartículas. Ao Prof. Humberson Rocha Silva e a toda equipe do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da UFRPE, pelo acolhimento e todo apoio durante o período em Recife. A clínica fitossanitária de Pernambuco (CLIFIPE) pela concessão do espaço e laboratório multiusuário no desenvolvimento da pesquisa.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Sumário

RESUMO GERAL.....	6
GENERAL ABSTRACT.....	8
CAPÍTULO 1	9
Introdução Geral.....	9
Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Infectadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10
1. O tomateiro	10
2. Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) no tomateiro	11
3. Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante	14
4. Nanopartículas	15
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO II	22
Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Infectadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Ensaio <i>in vitro</i>	29
2.2 Ensaio <i>in vivo</i>	29
2.2.1 Material vegetal e Condições de crescimento	29
2.2.2 Pulverização de NPsAg ⁺ e inoculação com <i>S sclerotiorum</i>	30
2.2.3 Avaliação do mofo branco	30
2.2.4 Determinação dos parâmetros fisiológicos.....	30
2.2.4.1 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos	30
2.2.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	31
2.2.5.1 Determinação de parâmetros bioquímicos.....	31
2.2.5.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e de defesa.....	31
2.2.5.3 Determinação da atividade de enzimas de defesa	32
3. Delineamento experimental e análise estatística	33
4. Resultados	33
4.1 Ensaio <i>in vitro</i>	33
4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	34
4.2.1 Avaliação do desenvolvimento do mofo branco.....	34
4.2.2 Determinação de pigmentos fotossintéticos	34
4.2.3 Atividades das enzimas do sistema antioxidativo.....	34
4.2.4 Atividade de enzima de defesa	35
5. DISCUSSÃO	36
AGRADECIMENTOS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
TABELAS E FIGURAS.....	42
CAPÍTULO III	48
CONCLUSÕES GERAIS	49

Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. No entanto, a produção tem sido afetada por fatores bióticos, incluindo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco. O uso da nanotecnologia tem se mostrado como estratégia promissora de controle de doenças na agricultura contra fitopatógenos. Assim, os objetivos desse estudo foram: i) avaliar o efeito de nanopartículas de prata (NPsAg⁺) sobre o crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* e ii) investigar os efeitos da aplicação de NPsAg⁺ sobre parâmetros epidemiológicos e bioquímicos em tomateiros infectados com *S. sclerotiorum*. Para avaliar o efeito de NPsAg⁺ sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, foram realizados testes *in vitro* com doses crescentes. Em seguida, um experimento *in vivo* foi instalado em condições controladas para avaliar os efeitos epidemiológicos e bioquímicos de plantas de tomate previamente tratadas com NPsAg⁺ e infectadas com *S. sclerotiorum*. Foi utilizada a cultivar Santa Cruz, e o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Os tratamentos utilizados foram água destilada (tratamento controle) e NPsAg⁺ (5 µL L⁻¹). A inoculação de *S. Sclerotiorum* foi realizada 24h após a aplicação da NpsAg⁺, com disco de micélio no centro da folha. Foram avaliadas as variáveis epidemiológicas tamanho da lesão e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), as variáveis fisiológicas relacionadas à concentração de pigmentos fotossintéticos e as variáveis bioquímicas, sendo elas as enzimas do estresse antioxidativo: ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e de defesa, fenilalanina amônia liase (FAL). No teste *in vitro*, os modelos de regressão polinomial para o índice de velocidade de crescimento micelial e diâmetro micelial demonstraram redução destas variáveis medida que as doses de NPsAg⁺ aumentaram, evidenciando efeito direto de NPsAg⁺ sobre *S. sclerotiorum*. No ensaio *in vivo*, a pulverização de NPsAg⁺ nas plantas reduziu significativamente a intensidade do mofo branco em comparação com o tratamento controle. Folhas de plantas tratadas com NPsAg⁺, por apresentar menor tamanho de lesão, demonstraram maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos. Adicionalmente, menor dano celular devido ao baixo nível de sintomas em folhas tratadas com NPsAg⁺, resultou em menores atividades de SOD, CAT, POX e APX. A atividade da FAL foi significativamente maior em plantas tratadas com NPsAg⁺ em comparação com o controle. Com isso, conclui-se que houve menor atividade das enzimas antioxidantes nas plantas tratadas com NPsAg⁺, em razão do menor nível de infecção celular. Além disso, a maior atividade da FAL evidencia uma capacidade de ativação de rotas de defesa em plantas de tomateiro

previamente tratadas com NPsAg⁺.

Palavras-chave: Sistema antioxidante, estresse biótico, *Solanum lycopersicum*, Tomate.

Effect of Silver Nanoparticles on Tomato Leaves Inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*

GENERAL ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most cultivated vegetables in the world. However, production has been affected by biotic factors, including the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold. The use of nanotechnology has been shown to be a potential disease control strategy in agriculture against phytopathogens. Thus, the objectives of this study were: i) to evaluate the direct effect of silver nanoparticles (Ag^+NPs) on the in vitro growth of *S. sclerotiorum* ii) to investigate the effects of Ag^+NPs application on epidemiological and biochemical parameters in tomato plants infected with *S. sclerotiorum*. To evaluate the effect of Ag^+NPs on the development of *S. sclerotiorum*, in vitro tests were performed with increasing doses. Then, an in vivo experiment was set up under controlled conditions to evaluate the epidemiological and biochemical effects of tomato plants previously treated with NPsAg^+ and infected with *S. sclerotiorum*. The Santa Cruz cultivar was used, and a completely randomized design with 5 replications was used. The treatments used were distilled water (control treatment) and Ag^+NPs ($5 \mu\text{L L}^{-1}$). Inoculation with *S. sclerotiorum* was performed 24 hours after Ag^+NPs application, with a mycelium disc in the center of the leaf. Epidemiological parameters (lesion size and area under the disease progress curve (AUDPC)), physiological parameters (concentration of photosynthetic pigments) and biochemical parameters through antioxidative stress enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD)) and defense (phenylalanine ammonia lyase (PAL)). In in vitro tests, adjustments of the polynomial regression model for the mycelial growth velocity index and mycelial diameter showed a reduction of these parameters as the Ag^+NPs doses increased, showing a direct effect of Ag^+NPs on *S. sclerotiorum*. In the in vivo assay, spraying Ag^+NPs on plants significantly reduced the intensity of white mold compared to the control treatment. leaves treated with Ag^+NPs , due to their smaller lesion size, showed higher concentrations of photosynthetic pigments. In addition, less cell damage due to the low level of symptoms in leaves treated with NPsAg^+ , resulted in lower SOD, CAT, POX and APX activities. PAL activity was significantly higher in plants treated with Ag^+NPs compared to the control. With this, it is concluded that there was a lower activity of the antioxidant enzymes in the plants treated with Ag^+NPs , due to the lower level of cellular infection, in addition, the greater activity of the PAL evidences a greater capacity of activation of defense routes in plants of tomato plants previously treated with Ag^+NPs .

Keywords: Antioxidant system, biotic stress, *Solanum lycopersicum*, Tomato.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

1. O tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem sua origem na América do Sul, nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador, porém seu processo de domesticação ocorreu no México, sendo considerado o centro de origem secundário (JENKINS, 1948; NAIKA; DAM; BARNHOORN, 2006). Após descoberto pelos espanhóis, o tomate foi levado da América para a Europa, sendo inicialmente cultivado como planta ornamental em jardins da Espanha, Itália e Inglaterra, de onde então se difundiu por todo o mundo. No Brasil, a introdução do tomateiro foi através dos imigrantes europeus no final do século XIX (ALVARENGA, 2004)

O tomateiro é uma dicotiledônea pertencente à Ordem Tubiflorae, família Solanaceae e gênero *Solanum*. É planta anual, herbácea, de caule redondo, piloso e macio quando jovem, tornando-se fibrosa com o passar do tempo. As flores são hermafroditas, sendo considerada uma planta autógama. O fruto é carnoso, com dois ou mais lóculos pequenos, com tamanho de uma cereja até aqueles com 0,5 Kg conforme a cultivar. Seu sistema radicular é do tipo pivotante, podendo chegar até 1,5 m de profundidade. As folhas são alternadas, compostas por número ímpar de folíolos, sendo pecioladas e de bordas serrilhadas (FILGUEIRA, 2008; GOULD 1992).

A cultura do tomateiro tem boas perspectivas econômicas, tendo em vista o alto rendimento proporcionado, sendo uma das principais hortaliças do mundo com produção mundial de mais de 189 milhões de toneladas no ano de 2021. O Brasil ocupa posição entre os dez maiores produtores de tomate no ranking mundial. A China é o maior produtor global com mais de 67,5 milhões de toneladas, seguida da Índia (21,1 milhões de toneladas), Turquia (13 milhões de toneladas), Estados Unidos (10,4 milhões de toneladas), Itália (6,6 milhões de toneladas), Egito (6,2 milhões toneladas), Espanha (4,7 milhões de toneladas), México (4,1 milhões de toneladas), Brasil (3,6 milhões de toneladas) e Nigéria (3,5 milhões de toneladas) (FAOSTAT 2021).

Segundo o IBGE (2021), a área cultivada no Brasil no ano de 2021, foi de cerca de 52,046 hectares (ha), com rendimento médio de 70.880 quilos por hectare. O estado de Goiás (GO) foi o maior produtor, sendo responsável por 27,8% do total em 2021, com uma produção de mais de 1 milhão de toneladas, seguido pelo estado de São Paulo (SP) com 742,395 toneladas (20,2%), Minas Gerais (MG) com 553,429 toneladas (15,4%) e Bahia (BA) com 261,404 toneladas (7,1%).

O manejo cultural do tomateiro é diversificado, podendo ser utilizados diferentes tratamentos culturais, sobretudo, de acordo com o hábito de crescimento da planta, podendo ser determinado ou indeterminado. As plantas com crescimento determinado são limitadas pela emissão de uma inflorescência terminal e a frutificação ocorre em um período concentrado, dentro de duas a três semanas, e geralmente são colhidos mecanicamente. Esses tomates são conhecidos popularmente como rasteiros (NAIKA; DAM; BARNHOORN, 2006; JACINTO et al. 2012). Os tomateiros com hábito de crescimento indeterminado possuem desenvolvimento contínuo das plantas após a emissão dos botões florais, sendo necessário o tutoramento e poda. Como o amadurecimento dos frutos é variável e constante na mesma planta, a colheita manual ocorre de forma parcelada (NAIKA; DAM; BARNHOORN, 2006)

Dentre os fatores que se mostram atrativos para o cultivo do tomateiro, destacam-se: o ciclo relativamente curto, opção entre um período de produção curto ou prolongado, adaptabilidade de diferentes sistemas de cultivo, valor econômico elevado e versatilidade do uso dos frutos, que podem ser usados naturais, processados, secos e enlatados (NAIKA; DAM; BARNHOORN, 2006)

Um dos fatores que têm contribuído para a elevação no consumo de tomate é a consolidação de redes “Fast food” que favorecem o consumo do fruto tanto nas formas processadas ou frescas. Aliado a esse fator, o fruto fresco apresenta baixo teor calórico, é rico em vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, os quais contribuem para uma dieta saudável e equilibrada (NAIKA; DAM; BARNHOORN, 2006) e é fonte primária de compostos antioxidantes como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, além de apresentar grandes quantidades do carotenoide, licopeno, substância que protege membranas celulares contra lesões causadas por radicais livres, desempenhando papel essencial na proteção de doenças (GAHLER; OTTO; BÖHM, 2003; JUMA et al., 2004)

2. Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) no tomateiro

Apesar do cultivo do tomateiro apresentar vantagens, vários fatores limitam a produtividade da cultura, entre eles, as doenças ocupam posição de destaque. O tomateiro é uma planta hospedeira de elevado número de fitopatógenos, cerca de 100 doenças já foram relatadas e algumas delas podem provocar perdas significativas se medidas de manejo não forem estabelecidas a tempo (REIS; LOPES 2012). Esta alta incidência de doenças ocorre por diversos fatores como, a variação climática e as diferentes formas de cultivo (LOPES; ÁVILA, 2005). As de origem biótica podem ser causadas por bactérias, vírus, fitoplasmas, nematoides, e com destaque os fungos, a qual maior número de doenças a eles são atribuídos (INOUE-

NAGATA et al., 2016). As principais doenças fúngicas são: pinta preta (*Alternaria linariae* Neerg.), requeima (*Phytophthora infestans*), oídio (*Oidiopsis taurica* Salmon e *Oidium neolycopersici* L.), mancha de Septoria (*Septoria lycopersici* Spegazzini.) mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.), murcha de Verticillium (*Verticillium dahliae* Kleb.), podridão de Sclerotium (*Sclerotium rolsii* Lib.), mancha de Corynespora (*Corynespora cassicola* Bert & Curt.), mancha de Stemphylium (*Stemphylium solani* Weber. e *S. lycopersici* Enjoji.), murcha de fusarium (*Fusarium solani*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib) (REIS; LOPES, 2012)

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, pertence ao reino fungi, filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia*. O fungo é descrito por (BOLAND e HALL (1994)l (1994) como um fungo necrotrófico e polífago. (ADAMS e AYERS (1979) relataram a ocorrência em cerca de 400 espécies de plantas suscetíveis entre plantas cultivadas e daninhas, causando a doença conhecida por mofo branco, podridão de esclerotinia, podridão branca da haste e murcha de esclerotinia, devido aos sintomas e sinais produzidos pelo patógeno.

No Brasil, o primeiro registro da doença ocorreu em 1921, no estado de São Paulo, na cultura na batata (CHAVES, 1964). Atualmente ocorre em uma gama extensa e diversa de hospedeiros, incluindo culturas agrícolas importante, como: feijão (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glicine max*), Ervilha (*Pisium sativum*), grão de bico (*Cicer arietinum*) amendoim (*Arachis hypogaea*), girassol (*Helianthus annuus*) e tomate (*S. Lycopersicum*) (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Na ausência do hospedeiro, o fungo persiste por longo período no solo, por meio de estrutura de resistência, os escleródios (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Os escleródios são um agregado de hifas, de formato irregular e coloração escura, devido a presença de melanina, que confere um papel importante na proteção contra condições adversas (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). A germinação do escleródio pode acontecer de duas maneiras, afetando diretamente o processo de infecção por *S. sclerotiorum* no campo, podendo germinar carpogenicamente (reprodução sexuada) ou miceliogenicamente (reprodução assexuada) (YOUNG et al., 2004). Quando germina miceliogenicamente, os escleródios presentes no solo produzem hifas, que colonizam o tecido senescente ou mortos e em seguida invadem os tecidos sadios logo acima da superfície do solo (LANE et al., 2018). Os escleródios que germinam carpogenicamente, produzem apotécio, onde são formados os ascósporos, que são dispersos no ar e infectam tecidos da planta, principalmente os botões florais. A germinação dos ascósporos pode ocorrer sobre o tecido sadio, mas não podem infectar a planta sem uma

fonte exógena de nutrientes, dessa forma, a floração é um período importante para a infecção, pois, as flores senescentes servem como fonte de nutriente, além, desta, no período de floração, a copa da planta está mais fechada, favorecendo as condições ambientais para o desenvolvimento da doença (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). As condições ambientais ideais para o desenvolvimento da doença compreendem a presença de água, luz e temperatura entre 12 e 18 °C (YOUNG et al., 2004).

A disseminação de *S. sclerotiorum* pode ocorrer através dos ascósporos que são espalhados pelo vento, e através dos escleródios em solos contaminados ou implementos agrícolas. As sementes infectadas com o micélio ou contaminadas com escleródios, são responsáveis pela disseminação a longas distâncias, e constituem a principal forma de disseminação do fungo (ADAMS; AYERS, 1979).

As lesões típicas de *S. sclerotiorum* são semelhantes nas diversas espécies agrícolas. Os sintomas iniciais são áreas encharcadas na junção do caule acima ou no nível do solo (RODRÍGUEZ et al., 2004). Uma vez que o patógeno se estabelece no tecido do hospedeiro, é possível observar no caule o crescimento superficial do micélio de coloração branca, semelhante a algodão, a parte encharcada torna-se seca, de coloração clara e dura, levando à murcha. Dentro do tecido afeto observa-se a formação de escleródios, normalmente na medula do caule ou na superfície em condições de alta umidade (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; MAZUMDAR, 2021).

O controle de *S. sclerotiorum* é complexo, devido a ampla gama de hospedeiros, ausência de cultivares resistentes, formação de escleródios que permanecem viáveis no solo por um longo período, e sua sobrevivência em sementes através do micélio dormente ou escleródios misturados a elas. Dessa forma, para reduzir as perdas ocasionadas pela doença, considera-se uma abordagem de manejo integrado, baseada em uma combinação incluindo uso de fungicidas, práticas culturais, seleção de cultivares, controle químico e biológico (PELTIER et al., 2012; SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018).

As práticas culturais incluem rotação de cultura, redução da densidade de plantas e manejo de plantas daninhas. *S. sclerotiorum* tem uma ampla gama de hospedeiros, dentre elas algumas plantas daninhas, portanto, o controle dessas plantas no campo reduz a fonte de inóculo (O'SULLIVAN; BELT; THATCHER, 2021). O uso de cobertura morta é uma estratégia de controle que visa diminuir a viabilidade dos escleródios bem como proporcionar uma barreira física à dispersão do inóculo. De modo geral, quanto mais espessa a cobertura morta, maior será a dificuldade para as estipes chegarem à superfície e formarem os apotécios (FERRAZ et al., 1999). O uso de sementes livres do fungo evita a entrada do patógeno em áreas indenidas

(HOFFMAN et al., 1998). O controle químico com fungicidas é amplamente utilizado no controle de *S. sclerotiorum*, no entanto, fatores ambientais da doença podem dificultar no momento da aplicação. Além disso, a aplicação de fungicida deve ser feita com objetivo de controlar a doença na safra atual e também pensando em reduzir a carga de escleródios no solo para as safras futuras (O'SULLIVAN; BELT; THATCHER, 2021).

3. Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante

As plantas passam por mudanças bioquímicas complexas em resposta ao estresse desencadeado por estressores bióticos, como fitopatógenos (DEMIDCHIK, 2015). Essa complexidade é resultado de uma longa batalha evolutiva, onde o patógeno tenta penetrar e colonizar, e a planta tenta reconhecer e se defender. Nesse sentido, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas sinalizadoras que regulam vias metabólicas das plantas com uma resposta imediata ao reconhecimento de patógenos (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018; FONES; PRESTON, 2012).

As ROS são um grupo de moléculas derivadas do oxigênio molecular (O_2). São considerados subprodutos do metabolismo aeróbico e são gerados em diferentes compartimentos celulares, como cloroplasto, peroxissomos e mitocôndrias (XIE et al., 2019). As principais formas de ROS nas células, incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) (MITTLER et al., 2022). O $OH^\cdot$ possui uma meia vida de $1\mu s$ e capacidade de migração (1nm), no entanto, é mais estável e interage com todas as moléculas celulares (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018; DEMIDCHIK, 2015).

Em condições normais de crescimento, as plantas usam ROS em pequenas concentrações como parte de uma cascata de sinalização que pode levar a várias defesas (BAXTER; MITTLER; SUZUKI, 2014). Em níveis mais altos, as ROS representam uma ameaça que pode levar a danos como: peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA, RNA e inativação de enzimas (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018; KÄRKÖNEN; KUCHITSU, 2015). Durante a interação da planta com o patógeno, a alta concentração de ROS pode ser danosa para ambos, no entanto, as plantas respondem ao estresse oxidativo mantendo o equilíbrio entre a síntese de ROS e mecanismos de eliminação (SAHU et al., 2022).

Para aliviar os danos induzidos por ROS, as plantas possuem mecanismos de eliminação de ROS, que podem ser classificados em dois tipos: sistema de defesa não enzimáticos e enzimáticos, que trabalham sinergicamente para neutralizar os radicais livres (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018). Os antioxidantes não enzimáticos é mediado principalmente por metabólitos de baixo peso molecular e são inespecíficos para diferentes ROS, como: ácido ascórbico, glutathione, prolina, poliaminas, betaina, carotenos, alguns flavonóides e α -tocoferol

(DEMIDCHIK, 2015). Enquanto os antioxidantes enzimáticos que mantêm a homeostase das ERO nas células vegetais, são: superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (AHMAD et al., 2010; DEMIDCHIK, 2015; DVOŘÁK et al., 2021).

A SOD forma a primeira linha de defesa contra danos induzidos por ROS, são metaloproteínas que catalisam a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e H_2O . Há três classes de SOD diferenciadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn SODs), ferro (Fe-SODs) e manganês (Mn-SODs). As enzimas Fe-SODs estão presentes nos cloroplastos, enquanto que as Mn-SODs situam-se na matriz mitocondrial. As Cu/Zn SODs são normalmente encontradas no citosol, sendo que algumas plantas contêm uma isoforma nos cloroplastos (BAXTER; MITTLER; SUZUKI, 2014; MITTLER, 2002).

A CAT é responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 em H_2O principalmente nos peroxissomos (MITTLER, 2002). Embora os peroxissomos sejam os principais produtores de H_2O_2 , os CATs também foram encontrados em cloroplastos, mitocôndrias e citosol (MHAMDI et al., 2010). A APX desempenha a mesma função da CAT no citosol e cloroplasto. A APX reduz H_2O_2 em H_2O , utilizando o ácido ascórbico como agente redutor (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018; DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas diversas combinações. A FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides. A FAL converte fenilalanina em ácido transcinâmico que está envolvida na síntese flavonoides, compostos fenólicos e lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas (DIXON'; PAIVA, 1995; RAHMAN; PUNJA, 2005).

4. Nanopartículas

O conceito da nanotecnologia foi introduzido em 1959 por Richard Feynman, no entanto, o termo Nanotecnologia foi utilizado somente em 1974 por Norio Taniguchi (HULKOTI; TARANATH, 2014). A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar, que compreende o estudo, fabricação, caracterização e manipulação de estruturas nanométricas (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). A nanopartículas (NPs) são definidas como uma estrutura natural ou fabricada, agregada ou deslocada, com uma ou mais dimensões externas variando de 1 a 100 nm (EUROPEIA, 2022). O principal diferencial da escala nanométrica é a potencialização das propriedades físicas e químicas, resultante da área superficial elevada, maior grau de dispersão e funcionalidades (ELMER; MA; WHITE, 2018).

Embora o estudo do uso de nanopartículas tenha sido introduzido em várias áreas, como, medicina, farmacologia e cosmetologia, a ideia do uso de NPs no desenvolvimento agrícola é recente (GOGOS; KNAUER; BUCHELI, 2012). Os nanomateriais possuem uma ampla gama de aplicação na agricultura moderna, como no armazenamento, embalagem, transporte e uso de nanofertilizantes (FRACETO et al., 2016; MEJIAS et al., 2021).

O manejo das doenças de plantas é um desafio na agricultura, e os nanomateriais se destacam como uma nova opção contra esse crescente desafio. O tamanho extremamente pequeno desses materiais e alta relação superfície/volume possibilitam novas rotas eficientes de entrega e favorecem a interação com as membranas microbianas (AVILA-QUEZADA; GOLINSKA; RAI, 2022). As NPs que exibem atividade supressora de doenças de plantas incluem não-metals, metalóides, óxidos metálicos e nanomateriais de carbono (ELMER; MA; WHITE, 2018). Prata, cobre, óxido de zinco, ouro, óxido de titânio e ferro são as mais usadas (GHOSH et al., 2021).

Entre os diferentes tipos de nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata se destacam por seu potencial antimicrobiano de amplo espectro (RAI et al., 2014). Na forma de íons ou nanopartículas, a prata é utilizada em diversas aplicações, como fins médicos, produtos farmacêuticos. Os íons de prata têm como alvo uma variedade de processos biológicos dentro dos microrganismos, principalmente visando a membrana celular (DAKAL et al., 2016).

A aplicação de nanopartículas de prata na proteção contra doenças de plantas oferece uma inovação no manejo de fitopatógenos (FORTUNATI; MAZZAGLIA; BALESTRA, 2019). Conforme observado por (MISHRA et al., 2014), nanopartículas de prata apresentou atividade antifúngica contra *Bipolaris sorokiniana*, controlando com sucesso sua infecção em plantas de trigo devido ao baixo potencial de germinação de conídios. Enquanto (IBRAHIM et al., 2020), relataram que nanopartículas de prata apresentaram forte atividade antifúngica contra o patógeno da brusone do arroz, *Magnaporthe oryzae*, com uma taxa de inibição de 88% no diâmetro micelial e inibição da germinação de esporos e formação de apressórios. A redução da produção de toxinas e inibição de crescimento micelial de *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum* foi observada por TARAZONA et al., 2019). Em estudo *in vivo*, foi observada a redução da severidade (58%) da cercosporiose do cafeeiro, causada por *Cercospora coffeicola* (CARVALHO et al., 2022)

Aplicações de AgNPs também tem sido avaliada em bactérias, como, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MISHRA et al., 2020), *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* (JIANG et al., 2022) *Acidovorax oryzae* (IBRAHIM et al., 2020) e nematoides, como *Meloidogyne javanica*

(GHAREEB et al., 2022), *Meloidogyne graminicola* (BARONIA et al., 2020), *Meloidogyne incógnita* (DANISH et al., 2021).

Diferentes mecanismos de ação de nanopartículas contra fitopatógenos têm sido sugeridos. As nanopartículas se aderem à membrana e parede celular, causando ruptura e comprometimento da integridade da membrana celular, que resulta em vazamento de macromoléculas e alterações no transporte através das membranas; produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em dano oxidativo; inibição da síntese de DNA; perda de atividade enzimática (AL-KHATTAF, 2021; DAKAL et al., 2016; HERNÁNDEZ-DÍAZ et al., 2021).

Os objetivos do presente estudo foram: i) avaliar o efeito direto de nanopartículas de prata (NPsAg⁺) sobre o crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* ii) investigar os efeitos da aplicação de NPsAg⁺ sobre parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos em folhas de tomateiro infectadas por *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. .; AYERS, W. . Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 896–899, 1979.
- AHMAD, P. et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 161–175, set. 2010.
- AL-KHATTAF, F. S. Gold and silver nanoparticles: Green synthesis, microbes, mechanism, factors, plant disease management and environmental risks. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 6, p. 3624–3631, 1 jun. 2021.
- AVILA-QUEZADA, G. D.; GOLINSKA, P.; RAI, M. Engineered nanomaterials in plant diseases: can we combat phytopathogens? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 117–129, 1 jan. 2022.
- BARONIA, R. et al. Silver nanoparticles as a potential nematocide against *Meloidogyne graminicola*. **Journal of Nematology**, v. 52, n. 1, p. 1–9, 2020.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 5, p. 1229–1240, 2014.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, jan. 2006.
- CARVALHO, C. A. et al. Nanoparticles in the management of brown eye spot in coffee. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 767–774, 1 jul. 2022.
- CZARNOCKA, W.; KARPIŃSKI, S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 4–20, 1 jul. 2018.
- DAKAL, T. C. et al. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, 16 nov. 2016.
- DANISH, M. et al. Green Synthesized Silver Nanoparticles Mitigate Biotic Stress Induced by *Meloidogyne incognita* in *Trachyspermum ammi* (L.) by Improving Growth, Biochemical, and Antioxidant Enzyme Activities. **ACS Omega**, v. 6, n. 17, p. 11389–11403, 4 maio 2021.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental ScienceFrontiers Media S.A.**, , 2 dez. 2014.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, 1 jan. 2015.
- DIXON', R. A.; PAIVA, N. L. **Stress-Induced Phenylpropanoid MetabolismThe Plant Cell**. [s.l.: s.n.].

DVOŘÁK, P. et al. Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2178, 1 fev. 2021.

ELMER, W.; MA, C.; WHITE, J. Nanoparticles for plant disease management. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 6, p. 66–70, 1 dez. 2018.

FERRAZ, L. C. L. et al. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, p. 77–82, 1999.

FONES, H.; PRESTON, G. M. Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 327, n. 1, p. 1–8, fev. 2012.

FORTUNATI, E.; MAZZAGLIA, A.; BALESTRA, G. M. Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 986–1000, 1 fev. 2019.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 22 mar. 2016.

GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of Vitamin C, Total Phenolics, and Antioxidant Capacity as Affected by Processing Tomatoes to Different Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7962–7968, 31 dez. 2003.

GHAREEB, R. Y. et al. Nematicidal activity of seaweed-synthesized silver nanoparticles and extracts against *Meloidogyne incognita* on tomato plants. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

GHOSH, S. et al. Mechanistic Aspects of Microbe-Mediated Nanoparticle Synthesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

GOGOS, A.; KNAUER, K.; BUCHELI, T. D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9781–9792, 3 out. 2012.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. THE DARK SIDE OF THE MYCELIUM: Melanins of Phytopathogenic Fungi. **Phytopathol**, v. 37, p. 447–471, 1999.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, J. A. et al. Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their antimicrobial activity against phytopathogens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 4, p. 1270–1287, 15 mar. 2021.

HOFFMAN, D. D. et al. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 82, n. 7, p. 826–829, 1998.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474–483, 1 set. 2014.

IBGE (2021) IBGE-Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acesso em 20 abril 2021

IBRAHIM, E. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using onion endophytic bacterium and

its antifungal activity against rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 1 dez. 2020.

JENKINS, J. A. The Origin of the Cultivated Tomato. **Economic Botany**, v. 2, n. 1, p. 379–392, 1948.

JIANG, L. et al. Biosynthesized silver nanoparticles inhibit *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* by directly destroying bacteria and inducing plant resistance in *Nicotiana benthamiana*. **Phytopathology Research**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2022.

JUMA, N. et al. Lycopene as an antioxidant agent. **Rev. Nutr**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.

KÄRKÖNEN, A.; KUCHITSU, K. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. **Phytochemistry**, v. 112, n. 1, p. 22–32, 2015.

LANE, D. W. et al. Heat-dried sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* myceliogenically germinate in water and are able to infect *Brassica napus*. **Crop and Pasture Science**, v. 69, n. 8, p. 765–774, 2018.

MAZUMDAR, P. Sclerotinia stem rot in tomato: a review on biology, pathogenicity, disease management and future research priorities. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 6, p. 1403–1431, 1 dez. 2021.

MEJIAS, J. H. et al. Nanofertilizers: A Cutting-Edge Approach to Increase Nitrogen Use Efficiency in Grasslands. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 19 mar. 2021.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: A focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.

MISHRA, S. et al. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 19 maio 2014.

MISHRA, S. et al. Antibacterial and biofilm inhibition activity of biofabricated silver nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing blight disease of rice instigates disease suppression. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, 1 abr. 2020.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 10, p. 663–679, 1 out. 2022.

NAIKA, S.; DAM, B. VAN.; BARNHOORN, R. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. [s.l.] Agromisa, 2006.

O’SULLIVAN, C. A.; BELT, K.; THATCHER, L. F. Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 20 ago. 2021.

PELTIER, A. J. et al. Biology, yield loss and control of sclerotinia stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 1 jun. 2012.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root

symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1103–1114, 1 dez. 2005.

RAI, M. et al. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1951–1961, mar. 2014.

RODRÍGUEZ, M. A. et al. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* attack on flower parts of *Helianthus annuus* heads in tolerant and susceptible varieties. **Mycopathologia**, v. 157, p. 291–302, 2004.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, mar. 2007.

SAHU, P. K. et al. **ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes.** *Frontiers in Plant Science* Frontiers Media S.A., , 24 out. 2022.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 1, 1 abr. 2018.

TARAZONA, A. et al. Antifungal effect of engineered silver nanoparticles on phytopathogenic and toxigenic *Fusarium* spp. and their impact on mycotoxin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, 2 out. 2019.

XIE, X. et al. The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

YOUNG, C. S. et al. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. **Plant Pathology**, v. 53, p. 387–397, 2004.

CAPÍTULO II

Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Efeitos de Nanopartículas de Prata em Folhas de Tomateiro Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Beatriz Souza Damasceno¹, Larissa Cavalcante Almeida¹, Luciana Tajany Dias do Nascimento¹, Thais Ribeiro Santiago², Edivan Rodrigues de Souza³, Jonas Alberto Rios^{1,3*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Fitopatologia.

² Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Solos.

⁴ Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Florestal-MG.

* Autor para correspondência

RESUMO

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, é potencialmente agressivo, apresentando potencial em reduzir a produção do tomateiro tornando o seu controle difícil. O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial de nanopartículas de prata (NPsAg⁺) em folhas de tomateiro infectadas por *S. sclerotiorum*. Primeiramente, testes *in vitro* foram realizados para verificar o efeito de doses crescentes de NpsAg⁺ sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Em seguida, um experimento *in vivo* foi instalado em condições controlas de casa de vegetação para avaliar os efeitos epidemiológicos, tamanho de lesão (TL) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)), fisiológicos: concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a (Clh *a*) clorofila b (Chl *b*) e carotenoides), bioquímicos: atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) e atividade da enzima de defesa fenilalanina amônio liase (FAL), em plantas de tomateiro previamente tratadas com NPsAg⁺ e infectadas com *S. sclerotiorum*. Foi utilizada a cultivar Santa Cruz, e o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Folhas de tomateiro foram previamente tratadas com água destilada (tratamento controle) ou NPsAg⁺ (5 µL L⁻¹) e posteriormente inoculadas com *S. sclerotiorum*. Nos testes *in vitro*, os ajustes do modelo de regressão polinomial para o índice de velocidade de crescimento micelial e diâmetro micelial demonstraram redução destes parâmetros à medida que as doses de NPsAg⁺ aumentaram, evidenciando um efeito significativo de NPsAg⁺ sobre *S. sclerotiorum*. No ensaio *in vivo*, a pulverização de NPsAg⁺ nas plantas reduziu significativamente a intensidade do mofo branco em comparação com o tratamento controle. Folhas de plantas tratadas com NPsAg⁺, por apresentar menor tamanho de lesão, demonstraram maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos. Adicionalmente, menor dano celular devido ao baixo nível de sintomas em folhas tratadas com NPsAg⁺, resultou em menores atividades de SOD, CAT, POX e APX. A atividade da FAL foi significativamente maior em plantas tratadas com NPsAg⁺ em comparação com o controle. Com isso, conclui-se que houve menor atividade das enzimas antioxidantes nas

plantas tratadas com NPsAg^+ , em razão do menor nível de infecção celular. Além disso, a maior atividade da FAL evidencia maior capacidade de ativação de rotas de defesa em plantas de tomateiro previamente tratadas com NPsAg^+ .

Palavras-chave: Sistema antioxidativo, nanotecnologia, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

White mold, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, has the potential to reduce tomato production and due to characteristics such as the pathogen's high aggressiveness, making its control difficult. The present study aimed to investigate the potential of silver nanoparticles (Ag^+NPs) in infected tomato leaves against *S. sclerotiorum* infection. First, in vitro tests were performed to verify the direct effect of increasing doses of Ag^+NPs on mycelial growth of *S. sclerotiorum*. Then, an in vivo experiment was installed under controlled greenhouse conditions to evaluate the epidemiological (denoted by lesion size (TL) and area under the disease progress curve (AUDPC)), physiological (concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* (Chl *a*) chlorophyll *b* (Chl *b*) and carotenoids), biochemical (activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX) and activity of the defense enzyme phenylalanine ammonium lyase (PAL)) in tomato plants previously treated with NPsAg^+ and infected with *S. sclerotiorum*. The Santa Cruz cultivar was used, and a completely randomized design with 5 replications. Tomato leaves were previously treated with distilled water (control treatment) or AgNPs ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) and subsequently not inoculated or inoculated with *S. sclerotiorum*. In in vitro tests, adjustments of the polynomial regression model for the mycelial growth velocity index and mycelial diameter showed a reduction of these parameters as the doses of Ag^+NPs increased, evidencing a direct effect of Ag^+NPs on *S. sclerotiorum*. In the in vivo test, spraying Ag^+NPs on plants significantly reduced white mold intensity compared to the control treatment. Leaves of plants treated with Ag^+NPs , due to their smaller size of the lesion, showed higher concentrations of photosynthetic

pigments. Additionally, less cell damage due to the low level of symptoms in leaves treated with Ag⁺NPs, resulted in lower SOD, CAT, POX and APX activities. The PAL activity was significantly higher in plants treated with Ag⁺NPs compared to the control. In conclusion, there was a lower activity of the antioxidant enzymes in the plants treated with Ag⁺NPs, due to the lower level of cellular infection, in addition, the greater activity of the PAL evidences a greater capacity of activation of defense routes in plants of tomato plants previously treated with Ag⁺NPs.

Keywords: Antioxidative system, nanotechnology, *Solanum lycopersicum*

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco, possui ampla gama de hospedeiros, podendo infectar mais de 400 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes, como feijão comum, soja, girassol e algumas hortaliças, além de plantas daninhas (Bolton et al. 2006; Liang e Rollins 2018). A produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pode ser afetada negativamente pelo mofo branco (Mazumdar 2021). Sendo um patógeno necrotrófico, sua infecção resulta em danos significativos nos tecidos vegetais. O fungo produz enzimas líticas e toxinas que degradam a parede celular do hospedeiro (Liang e Rollins 2018), além do ácido oxálico que tem papel central na patogênese (Hossain et al. 2023). O patógeno ataca principalmente no estágio final da floração, os sintomas iniciais são áreas encharcadas na junção do caule acima ou no nível do solo (Rodríguez et al. 2004). Uma vez que o patógeno se estabelece no tecido do hospedeiro, é possível observar o crescimento superficial do micélio de coloração branca, semelhante a algodão (Bolton et al. 2006). O manejo do mofo branco envolve métodos culturais, químicos e biológicos, as estratégias mais usadas incluem o uso de sementes saudáveis, aumento do espaçamento, cobertura morta e principalmente, aplicação de fungicidas (Peltier et al. 2012). No entanto, tais medidas tem eficiência limitada devido a ampla gama de hospedeiros e a persistência dos escleródios que permanecem viáveis no solo por um longo período (Bolton et al. 2006). Para superar esses obstáculos, surge a necessidade de explorar novas abordagens ou estratégias de manejo.

A nanotecnologia tem se destacado como alternativa promissora no manejo de doenças de plantas, com destaque para o uso de nanopartículas metálicas (Avila-Quezada et al. 2022). Entre as nanopartículas, as nanopartículas de prata (NPsAg⁺) são as mais estudadas devido a sua atividade antimicrobiana (Hernández-Díaz et al. 2021). As NPsAg⁺ causam danos estruturais a membrana e parede celular, danificam biomoléculas como, DNA, proteínas e lipídios, causando a morte celular (Dakal et al. 2016; Nayantara e Kaur 2018; Nisar et al. 2019). Alguns relatos descrevem a atividade eficiente de NPsAg⁺ no controle de uma ampla gama de

fungos causadores de doença em planta. Por exemplo, o crescimento *in vitro* de *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* foi reduzido na presença de NPsAg⁺ (Mishra et al. 2014; Ashraf et al. 2020; Ibrahim et al. 2020). Em estudo *in vivo*, foi observada a redução da severidade (58%) da cercosporiose do cafeeiro, causada por *Cercospora coffeicola* (Carvalho et al. 2022), NPsAg⁺ também demonstrou potencial de controle para mancha foliar no trigo, causada por *B. sorokiniana* (Mishra et al. 2014).

Embora os estudos dos efeitos de NPsAg⁺ no controle de doença de plantas tenha aumentado, os efeitos em plantas de tomate infectada por *S. sclerotiorum* ainda não foram investigados. Considerando a pouca de informação sobre o potencial de NPsAg⁺ em controlar o mofo branco em tomateiro, esse trabalho teve como objetivo (i) avaliar o efeito direto de NPsAg⁺ sobre o crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* (ii) investigar os efeitos da aplicação de NPsAg⁺ sobre parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos em tomateiro infectados com *S. sclerotiorum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio *in vitro*

O ensaio *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O efeito de NPsAg^+ no desenvolvimento de *S. sclerotiorum* foi avaliado através do crescimento micelial, utilizando as doses de 0; 1; 5; 7,5 e 10 $\mu\text{L L}^{-1}$. Para avaliação do crescimento micelial, os tratamentos foram incorporados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) previamente autoclavado, e em seguida vertidos em placas de Petri (10 mL/placa). Posteriormente, um disco de BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio fúngico obtido da borda de uma colônia de *S. sclerotiorum* com 7 dias de crescimento, foi colocado no centro das placas de Petri, que foram mantidas em uma câmara de crescimento (20 °C e fotoperíodo de 12 h). A colônia do fungo em cada placa de Petri foi medida diariamente para obter seu diâmetro em duas direções ortogonais usando um paquímetro digital, até um dos tratamentos atingir o diâmetro total da placa. Para cada tratamento foram utilizadas 6 repetições. O índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVCM} = (C_1 / N_1) + (C_2 / N_2) + \dots + (C_n / N_n)$$

Em que: C_1 , C_2 e C_n = diâmetro da colônia na primeira, segunda e n-ésima avaliação; N_1 , N_2 , N_n = número de dias após a instalação do ensaio.

2.2 Ensaio *in vivo*

2.2.1 Material vegetal e Condições de crescimento

Sementes da cultivar Santa Cruz Kada (Isla sementes), foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, preenchidas com substrato comercial contendo casca de pinus, vermiculita, turfa e carvão (Basaplant® Artur Nogueira, São Paulo, Brasil), 15 dias após emergência as mudas foram transplantadas para vaso plástico (2 dm³) contendo uma mistura de substrato Basaplant® e areia na proporção 2:1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e adubadas semanalmente com 100 mL de solução nutritiva composta de g/L⁻¹: 6,4 KCl; 3,48

K₂SO₄; 5,01 MgSO₄.7H₂O; 2,03 (NH₂)₂CO; 0,009 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O; 0,054 H₃BO₃; 0,222 ZnSO₄.7H₂O; 0,058 CuSO₄.5H₂O; 0,137 MnCl₂.4H₂O; 0,27 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 0,37 g L⁻¹ de EDTA dissódico. As plantas foram irrigadas diariamente conforme a necessidade das plantas.

2.2.2 Pulverização de NPsAg⁺ e inoculação com *S. sclerotiorum*

Plantas de tomate com 25 dias de idade foram tratadas com solução de NPsAg⁺ (5 µL L⁻¹, pH ajustado de 6,2) usando um atomizador VL Airbrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL, EUA). O tratamento controle consistiu na pulverização de água destilada. A aplicação foi realizada 24 horas antes da inoculação com *S. sclerotiorum*. Para o procedimento de inoculação, o fungo foi cultivado em BDA, em uma câmara de crescimento (20 °C e 12h fotoperíodo). Um disco de ágar (5mm de diâmetro) contendo micélio fungico em crescimento, foi removido e utilizado para inocular a superfície adaxial de folíolos de tomateiro (três folíolos por planta). As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, sob temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 85 ± 5%, onde permaneceram até o final do experimento.

2.2.3 Avaliação do mofo branco

Os folíolos inoculados de cada planta foram coletados em 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai) e as lesões foram medidas em duas direções ortogonais usando um paquímetro digital para obter a área de lesão. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada utilizando a integração trapezoidal da curva de progresso do mofo branco ao longo do tempo usando a fórmula proposta por (Shaner e Finney (1977).

2.2.4 Determinação dos parâmetros fisiológicos

2.2.4.1 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de Chla, Chlb e carotenoides foram determinadas usando o dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator (Santos et al. 2008). Cinco discos de folhas (0,5 cm de diâmetro) foram coletados as 24, 48 e 72 hai. Os discos coletados foram imersos em tubos

de vidro contendo 5 mL de solução saturada com DMSO (Wellburn 1994), e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 24 h. As absorbâncias dos extratos foram lidas a 480; 649,1 e 665,1 nm usando um espectrofotômetro (Multiskan Sky Microplate, Thermo Fisher Scientific). A solução saturada de DMSO foi usada como branco.

2.2.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

2.2.5.1 Determinação de parâmetros bioquímicos

Para todas as análises bioquímicas, 200 mg de tecido foliar foram moídos em nitrogênio líquido usando um almofariz e pilão. O pó fino foi imediatamente homogeneizado em 1,5 ml de uma solução contendo 50 mM de um tampão de fosfato de potássio (pH 6,8), 0,1 mM de etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 2% (peso v⁻¹) polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 ° C, e o sobrenadante foi usado como um extrato bruto da enzima.

2.2.5.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e de defesa

A atividade da SOD foi determinada medindo sua capacidade de inibir fotoquimicamente o nitroazul tetrazólio (NBT), conforme descrito por (Del Longo et al. 1993). A reação foi iniciada adicionando 10 µl do extrato bruto da enzima a 240 µl de uma mistura contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 75 µM, NTB 75, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. A reação foi realizada a 25 ° C sob luz da lâmpada de 15 W por 30 min. Após a exposição à luz, esta foi desligada e a produção de azul formazana, resultante da fotorredução de NBT, foi medida a 560 nm com um espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., MA) (Giannopolitis and Ries 1977). Para as amostras controle, a mistura de reação foi mantida no escuro por 30 min e a absorbância medida a 560 nm. Os valores obtidos das amostras experimentais (leves) foram subtraídos dos valores obtidos das amostras de controle para determinar a atividade da SOD. A quantidade de enzima

necessária para inibir a fotorredução de NBT em 50% foi definida como uma unidade de SOD (Beauchamp e Fridovich 1971).

A atividade de CAT foi determinada seguindo o método proposto por (Cakmak et al. 1991). A reação foi iniciada após a adição de 5 μ l do extrato enzimático bruto a 245 μ l de uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e peróxido de hidrogênio 20 mM. A determinação da atividade de CAT foi baseada na taxa de decomposição de H_2O_2 medida no espectrofotômetro a 240 nm por 1 min a 25 °C. Um coeficiente de extinção de $36 M^{-1} cm^{-1}$ foi usado para calcular a atividade de CAT (Anderson' et al. 1995).

A atividade da POX foi analisada após a determinação colorimétrica da oxidação do pirogalol, de acordo com (Kar e Mishra 1976). A reação foi iniciada após a adição de 15 μ l do extrato enzimático bruto a 235 μ l de uma mistura de reação contendo fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM. A atividade da POX foi medida pela absorvância da purpurogalina colorida a 420 nm por 1 min a 25°C. Um coeficiente de extinção de $2,47 mM^{-1} cm^{-1}$ foi usado para calcular a atividade POX (Maehly e Uflith 1954)

A atividade APX foi analisada usando o método proposto por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 10 μ l do extrato enzimático bruto a 240 μ l de uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H_2O_2 e 0,8 mM de ascorbato. A atividade do APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm por 1 min a 25 °C. Um coeficiente de extinção de $2,8 mM^{-1} cm^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade de APX. Essas atividades enzimáticas foram expressas com base em proteínas e sua concentração foi determinada de acordo com o método de (Bradford 1976)

2.2.5.3 Determinação da atividade de enzimas de defesa

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi avaliada seguindo o método proposto por (Guo et al. 2007), com algumas modificações. Primeiro, a reação foi iniciada pela adição de 10 μ L de extrato enzimático bruto a 240 mL de uma mistura de reação contendo tampão de borato de sódio 40 mM (pH 8,8) e L- fenilalanina 20 mM. A mistura reacional foi incubada a

30°C durante 1 h. Para as amostras controle, o extrato foi substituído por tampão borato. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de 6 N HCl. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi registrada a 290 nm. A atividade FAL foi estimada usando um coeficiente de extinção de $10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zucker 1965). A atividade enzimática foi expressa com base na concentração de proteína determinada em cada amostra de acordo com o método de (Bradford 1976).

3. Delineamento experimental e análise estatística

O ensaio *in vitro* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, e o crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento foram estimados usando o ajuste de modelo de regressão polinomial, sendo escolhido aquele com maior R². Os ensaios *in vivo* foram realizados em condições controladas em esquema fatorial 2x2, sendo o primeiro fator a inoculação (plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI) com *S. sclerotiorum*) e o segundo, o tratamento com NPsAg⁺ (plantas não tratadas e tratadas com NPsAg⁺), dispostos em delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições. Cada unidade amostral foi composta por um vaso contendo três plantas. Os dados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Dentro de cada tempo de amostragem, as médias dos tratamentos foram comparadas usando teste t ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando software SAS (v.6.12; SAS 14 Institute, Inc.).

4. Resultados

4.1 Ensaio *in vitro*

Nos ensaios *in vitro*, os ajustes de regressão polinomial para os parâmetros IVCm e diâmetro da colônia demonstraram redução a medida em que as doses de NPsAg⁺ aumentaram. Houve uma redução de 54, 83, 93 e 95% do IVCm (Fig. 1b) para as doses 1, 5, 7,5 e 10 µL de NPsAg⁺ L⁻¹, respectivamente. Similarmente, para o diâmetro médio da colônia, a redução foi de 38, 74, 88 e 93%. (Fig. 1a).

4.2 Ensaio *in vivo*

Os efeitos isolados dos fatores inoculação e tratamento com NPsAg⁺, bem como as interações desses sobre os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos estão representados na (Tabela 1).

4.2.1 Avaliação do desenvolvimento do mofo branco

Foram observadas diferenças significativas para os parâmetros epidemiológicos entre plantas não tratadas (-NPsAg⁺) e tratadas (+NPsAg⁺) com nanopartículas de prata. Nas plantas tratadas com NPsAg⁺, houve redução no tamanho da lesão em 83, 30 e 48% às 24, 48 e 72 hai, respectivamente, em relação ao controle. A AACPD foi reduzida em 50% em plantas tratadas com NPsAg⁺ em comparação as plantas tratadas com água (Fig. 2).

4.2.2 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Na ausência da infecção por *S. sclerotiorum*, plantas tratadas com NPsAg⁺ não apresentou diferenças significativa nas concentrações de pigmentos, quando comparada as plantas não tratadas. Nas plantas inoculadas, ... os resultados mostraram que a infecção reduziu significativamente o conteúdo de pigmentos nos tempos avaliados. A concentração de Chl *a* foram 34, 42 e 53% inferior às 24, 48 e 72 hai em relação as plantas não tratadas com NPsAg⁺, houve também uma redução na concentração de chl *b* (3,2, 18 e 33%) e carotenoides (39, 51 e 61 %) nos mesmos períodos avaliados. Por outro lado, as plantas inoculadas +NPsAg⁺ apresentaram aumento nas concentrações de Chl *a* (32, 35 e 42%), Chl *b* (23, 33 e 30%) e carotenoides (31, 39 e 44%) em comparação as plantas inoculadas -NPsAg⁺ (Fig. 3).

4.2.3 Atividades das enzimas do sistema antioxidativo

Foi observado alterações da atividade das enzimas do sistema antioxidativo entre plantas inoculadas e não inoculadas, sendo as primeiras apresentando aumento significativo na atividade da POX (60, 68 e 77%) às 24, 48 e 72 hai, SOD (14 e 18%) e CAT (66 e 47%) às 48 e 72 hai e APX (46%) às 48hai em comparação às plantas não inoculadas. Em contrapartida, as

plantas inoculadas +NPsAg⁺ apresentaram redução nas atividades da POX (34, 64 e 42%) às 24, 48 e 72hai, respectivamente, da SOD (18 e 30%) e CAT (29 e 26%) às 48 e 72hai, respectivamente e APX (21%) às 48hai, quando comparada as plantas não tratadas (Fig. 4).

4.2.4 Atividade de enzima de defesa

A atividade da FAL foi superior nas plantas infectadas com *S. sclerotiorum* quando comparadas as plantas sadias, às 72 hai com acréscimo de 54%. Contudo, a atividade FAL em plantas inoculadas e tratadas com NPsAg⁺ aumentou 49 e 24% quando comparada com o tratamento inoculado sem NPsAg⁺ às 24 e 72hai respectivamente (Fig. 5).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo, até o conhecimento dos autores, é o primeiro relato envolvendo o potencial da aplicação preventiva de NPsAg⁺ na redução dos sintomas do mofo branco em tomateiro. Este efeito reduziu o estresse fisiológico provocado pela infecção por *S. sclerotiorum*, através da observação da menor destruição dos pigmentos fotossintéticos. Além disso, a menor severidade do mofo branco em plantas previamente tratadas com NPsAg⁺ manteve a homeostase do sistema antioxidante, o que sugeriu um menor dano celular induzido por ROS.

O estudo *in vitro* demonstrou que NPsAg⁺ exerce um efeito direto sobre o crescimento micelial e o índice de velocidade de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* para todas as doses testadas. Estudos anteriores investigaram o uso de NPsAg⁺ sobre *S. sclerotiorum* e demonstraram comportamento semelhante para o crescimento micelial, além da inibição de formação de escleródios (Guilger-Casagrande et al. 2019; Kaman e Dutta 2019) Como observado também por (Tomah et al. 2020) em imagens de microscopia eletrônica de varredura, alterações morfológicas nas superfícies dos escleródios e nas hifas, além da presença das nanopartículas nos escleródios confirmada por espectroscopia de energia dispersiva, revelaram interação física direta da nanopartícula com a célula fúngica. O potencial de nanopartículas também tem sido testado sobre outros fitopatógenos. Foi investigado por (Dashora et al. 2022) o efeito de NPsAg⁺ contra *A. alternata*, que mostraram inibição no crescimento micelial de até 81% na dose de 500ppm (Kumari et al. 2017) estudaram o papel das nanopartículas contra *Alternaria solani* utilizando nanopartículas de prata sintetizadas em células de *Trichoderma viride*, os autores observaram uma redução de 100% na contagem de esporos após o terceiro dia de tratamento e redução de 73,3% na biomassa fúngica após o sétimo dia de tratamento. Efeito similar foi demonstrado para outros fungos fitopatogênicos. *Alternaria alternata* (Dashora et al. 2022), *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia luneta*, *Sclerotium rolfsii* (Mishra and

Singh 2017), *Fusarium oxysporum* (Al-Otibi et al. 2021), *Fusarium graminearum* (Jian et al. 2022).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na atividade antimicrobiana da nanopartícula de prata, dentre eles, a ruptura da parede celular e dano ao DNA se destaca como principal causa na morte celular (Dakal et al. 2016; Hernández-Díaz et al. 2021; Al-khattaf 2021). As nanopartículas interagem intimamente com a célula microbiana a partir da adesão a parede e membrana celular, penetração e posterior comprometimento da permeabilidade da membrana, resultando em vazamento de macromoléculas, além de ruptura de biomoléculas e organelas (Nisar et al. 2019; Mikhailova 2020). Adicionalmente, as nanopartículas podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, e consequentemente causar estresse oxidativo às estruturas celulares (Dakal et al. 2016; Kumari et al. 2017). Diante deste resultado é plausível pensar que uma vez presente nos tecidos foliares de tomateiro, as NPsAg^+ podem proporcionar maior efetividade de controle por reduzir diretamente as estruturas de infecção de *S. sclerotiorum*. Estudos posteriores poderão ser realizado para verificar o efeito do NPsAg^+ sobre a produção de escleródios, podendo ser as NPsAg^+ uma importante ferramenta sobre o inóculo inicial da lavoura.

Analisando os parâmetros fisiológicos, foi observado que, à medida que as lesões do mofo branco aumentaram nos folíolos não tratados, a concentração de chl *a*, chl *b* e carotenoides diminuíram. Resultado semelhante foi observado por (Chaves et al. 2021) em folhas de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum*. (Fagundes-Nacarath et al. 2018) observou uma redução de pigmentos fotossintéticos em plantas de soja inoculadas com *S. sclerotiorum* selvagem quando comparado ao isolado mutantes de ácido oxálico, reforçando que o ácido oxálico pode atuar na degradação do tecido foliar causando degeneração de cloroplasto. Nas plantas inoculadas e tratadas com NPsAg^+ , a concentração de pigmentos fotossintéticos das plantas foi preservada, indicando seu efeito positivo para manter a funcionalidade da fotossíntese nos folíolos de tomateiro.

Nas interações planta-patógeno, as EROS funcionam como um mecanismo de defesa (Sahu et al. 2022). Para evitar danos celulares induzidos por EROS, as plantas usam mecanismos antioxidantes que incluem a SOD, que é responsável pela remoção O_2^- por meio de sua conversão em H_2O_2 e O_2^- , enquanto CAT, POX e APX desintoxicam o H_2O_2 (Czarnocka e Karpiński 2018). As atividades das enzimas do sistema antioxidativo aumentaram com a infecção por *S. sclerotiorum*, demonstrando que após a infecção houve um estresse oxidativo e consequente aumento na atividade da SOD, CAT, POX e APX. Altas atividades de dessas enzimas foram observadas em folhas de tomateiro em resposta a infecção de *S. sclerotiorum*, além do aumento da concentração de O_2^- e malondialdeído (MDA) um marcador de peroxidação lipídica (Fagundes-Nacarath et al. 2018). Contudo, a atividade dessas enzimas foi menor para as plantas tratadas +NPsAg⁺, o que está relacionada com a redução do sintoma de mofo branco nessas plantas.

A FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, Essa via é rica em uma ampla gama de compostos fenólicos, como flavonoides, hormônios vegetais, antocianinas, lignina e fitoalexinas que desempenham um papel importante na defesa vegetal (Dixon et al. 2002). Nesse estudo, a maior atividade da FAL foi observada para plantas inoculadas e tratadas com NPsAg⁺, assim, a redução dos sintomas do mofo branco pode ser atribuída a ação direta da NPsAg⁺ contra *S. sclerotiorum* e seu efeito positivo na atividade da FAL.

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que o uso de NPsAg⁺ mostrou potencial de inibição eficiente contra *S. sclerotiorum*, e redução do sintoma de mofo branco em tomateiro, aliado ao menor estresse oxidativo e potencialização da atividade da FAL.

AGRADECIMENTOS

AO Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado. À Prof^a Thaís Ribeiro Santiago da Universidade de Brasília (UnB), pelo

preparo e envio das Nanopartículas de prata. A Clínica Fitossanitária de Pernambuco pela disponibilidade de estrutura para realização das análises bioquímicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-khattaf FS (2021) Gold and silver nanoparticles: Green synthesis, microbes, mechanism, factors, plant disease management and environmental risks. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28:3624–3631.
- Al-Otibi F, Kahkasahn P, Al-Saif N, Alharbi R, Bokhari NA, Albasher G, Al-Otaibi RM, Al-mosa M (2021) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Malva parviflora* and their antifungal activity. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 2229–2235
- Anderson' MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. *Plant Physiology* 109:1247–1248
- Ashraf H, Anjum T, Riaz S, Naseem S (2020) Microwave-Assisted Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Melia azedarach* for the Management of *Fusarium* Wilt in Tomato. *Frontier in Microbiology* 11:1–22.
- Avila-Quezada GD, Golinska P, Rai M (2022) Engineered nanomaterials in plant diseases: can we combat phytopathogens? *Appl Microbiology and Biotechnology* 106:117–129.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analutical Biochemistry* 44:276–287
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7:1–16.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Cakmak I, Cakmak WJH, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, siiperoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiology Plantarum* 83:463–168
- Chaves JAA, Oliveira LM, Silva LC, Silva BN, Dias CS, Rios JÁ, Rodrigues FA (2021) Physiological and biochemical responses of tomato plants to white mold affected by manganese phosphite. *Journal af Phytopathology* 169:149–167.
- Czarnocka W, Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology Medecine* 122:4–20.
- Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V (2016) Biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblicafruit extract and its inhibitory action against the pathogen acidovorax oryzaestrain RS-2 of rice bacterial brown strip.

- Dashora A, Rathore K, Raj S, Sharma K (2022) Synthesis of silver nanoparticles employing *Polyalthia longifolia* leaf extract and their in vitro antifungal activity against phytopathogen. *Biochemistry and Biophysics Reports* 31:101320.
- Del Longo OT, Gonzalez CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. . *Plant and Cell Physiology* 34:1023–1028
- Dixon, R. A., and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell* 7: 1085.
- Fagundes-Nacarath IRF, Debona D, Rodrigues FA (2018) Oxalic acid-mediated biochemical and physiological changes in the common bean-*Sclerotinia sclerotiorum* interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 129:109–121.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 59:309-314
- Guilger-Casagrande M, Germano-Costa T, Pasquoto-Stigliani T, et al (2019) Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports* 9:1–9.
- Guo Y, Liu L, Zhao J, Bi Y (2007) Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 42:1012–1018.
- Hernández-Díaz JA, Garza-García JJO, Zamudio-Ojeda A, Leon-Morales J, López-Velázquez JC, García-morales S (2021) Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their antimicrobial activity against phytopathogens. *Journal of the Science Food and Agriculture* 101:1270–1287.
- Hossain M, Sultana F, Li W, Tran LP (2023) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. 1–22
- Ibrahim E, Luo J, Ahmed T, et al (2020) Biosynthesis of silver nanoparticles using onion endophytic bacterium and its antifungal activity against rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Jornal of Fungi* 6:1–13.
- Jian Y, Chen X, Ahmed T, Shang Q, Zhang S, Ma Z, Yin Y (2022) Toxicity and action mechanisms of silver nanoparticles against the mycotoxin-producing fungus *Fusarium graminearum*. *Journal od Advanced Research* 38:1–12.
- Kaman PK, Dutta P (2019) Synthesis, characterization and antifungal activity of biosynthesized silver nanoparticle. *Indian Phytopathology* 72:79–88.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57:315–319.
- Kumari M, Pandey S, Bhattacharya A, Mishra A, Nautiyal CS (2017) Protective role of biosynthesized silver nanoparticles against early blight disease in *Solanum lycopersicum*. *Plant Physiology Biochemistry* 121:216–225.
- Liang X, Rollins JA (2018) Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 108:1128–1140.

- Maehly AC, Uflith BC (1954) The Assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis I*: 358-423
- Mazumdar P (2021) Sclerotinia stem rot in tomato: a review on biology, pathogenicity, disease management and future research priorities. *Journal of Plant Disiases and Protection* 128:1403–1431.
- Mikhailova EO (2020) Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *Journal Functional Biomaterials* 11
- Mishra S, Singh BR, Singh A, Singh A, Keswani C, Naqvi AH (2014) Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS One* 9: 5
- Mishra S, Singh HB (2017) Integrated Approach of Agri-nanotechnology: Challenges and Future Trends. *Frontiers in Plant Science* 8
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867–880
- Nayantara, Kaur P (2018) Biosynthesis of nanoparticles using eco-friendly factories and their role in plant pathogenicity: a review. *Biotechnology Reserach Innovation* 2:63–73.
- Nisar P, Ali N, Rahman L, et al (2019) Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *Journal of Biological Inorganoc Chemistry* 24:929–941.
- Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA, Esker PD (2012) Biology, yield loss and control of *sclerotinia* stem rot of soybean. *Journal of Integrated Pest Management* 3:1–7.
- Sahu PK, Jayalakshmi K, Tilgam J, Gupta A, Nagaraju Y, Kumar A, Hamid S, Singh HV, Minkina T, Rajput VD, Rajawat MVS (2022) ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontier in Plant Science* 13.
- Shaner G, Finney RE, I WKC, et al (1977) The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox. Wheat. *Phytopathology* 77 1051-1056
- Tomah AA, Alamer ISA, Li B, Zhang JZ (2020) Mycosynthesis of silver nanoparticles using screened trichoderma isolates and their antifungal activity against *sclerotinia sclerotiorum*. *Nanomaterials* 10:1–15.
- Wellburn AR (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307–313.
- Zucker M (1965) Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. *Physiology* 40.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos individuais e interações de nanopartículas de Prata (NPsAg⁺), Inoculação (I) e época de avaliação (EA) sobre os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos em plantas de tomateiro.

^a Variáveis	^b F valores						
	NPsAg ⁺	I	EA	NPs × I	NPs × EA	I × EA	NPs × I × EA
TL	9,60 ^{***}		216,00 ^{***}		164,80 ^{***}		
AACPD	4456,17 ^{***}						
FAL	38,20 ^{***}	0,18 [*]	58,20 ^{***}	0,08 ^{ns}	9,42 ^{***}	34,28 ^{***}	0,17 ^{ns}
SOD	0,08 ^{ns}	17,51 ^{***}	7,65 ^{***}	5,92 [*]	4,21 ^{**}	9,18 ^{**}	11,52 ^{***}
CAT	0,08 ^{ns}	48,05 ^{***}	13,31 ^{***}	0,07 ^{ns}	11,97 ^{***}	28,79 ^{***}	4,22 ^{**}
POX	5,54 [*]	64,80 ^{***}	0,06 ^{ns}	2,41 ^{ns}	7,65 ^{**}	0,41 ^{ns}	12,41 ^{***}
APX	0,19 [*]	5,09 ^{**}	8,46 ^{***}	0,14 ^{ns}	2,74 ^{ns}	5,24 ^{***}	0,14 ^{ns}
Chl <i>b</i>	66,16 ^{***}	26,56 ^{***}	9,32 ^{***}	0,25 ^{ns}	0,73 ^{ns}	1,96 ^{ns}	0,64 ^{ns}
Chl <i>a</i>	44,49 ^{***}	115,69 ^{***}	4,09 ^{**}	25,24 ^{***}	0,03 ^{ns}	2,29 ^{ns}	0,11 ^{ns}
Carotenoides	3,47 [*]	17,76 [*]	3,21 [*]	2,48 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,34 ^{ns}

^a Efeito principal e efeito da interação dos fatores NPs (NPs; não pulverizada ou pulverizada com Nanopartículas de prata), Inoculação de Plantas (I; não inoculada e inoculada com *S. sclerotiorum*) e época de amostragem (EA; 48 e 72 horas após a inoculação).

^b Níveis de probabilidade: ns = não significativo, * = significativo a 0.05; ** = 0.01 e *** = 0.001.

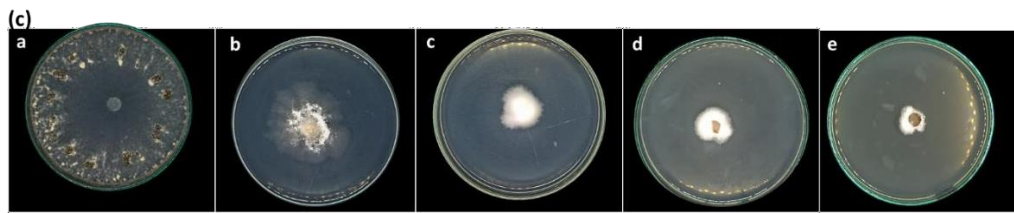
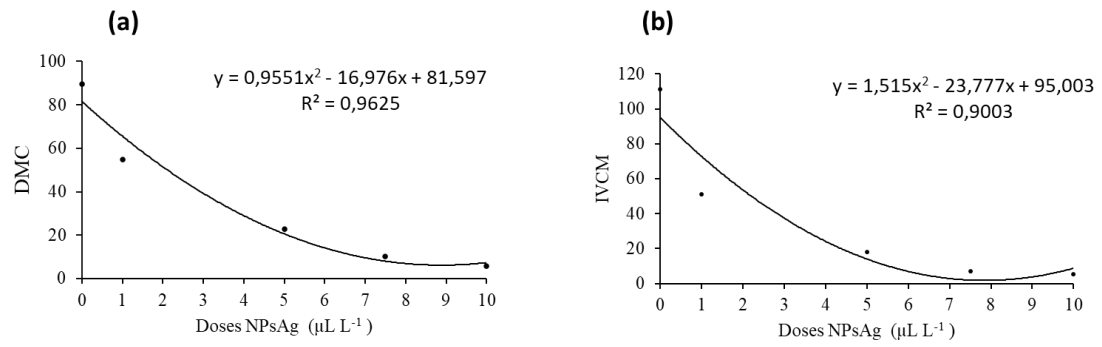


Figura 1. Análise de regressão do efeito de Nanopartículas de prata (+NPsAg⁺) sobre (a) o diâmetro médio final e (b) índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). (c) Crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em BDA contendo 0 (a), 1 µL (b), 5 µL (c), 7,5 µL (d) e 10 µL (e) de NPsAg⁺ L⁻¹.

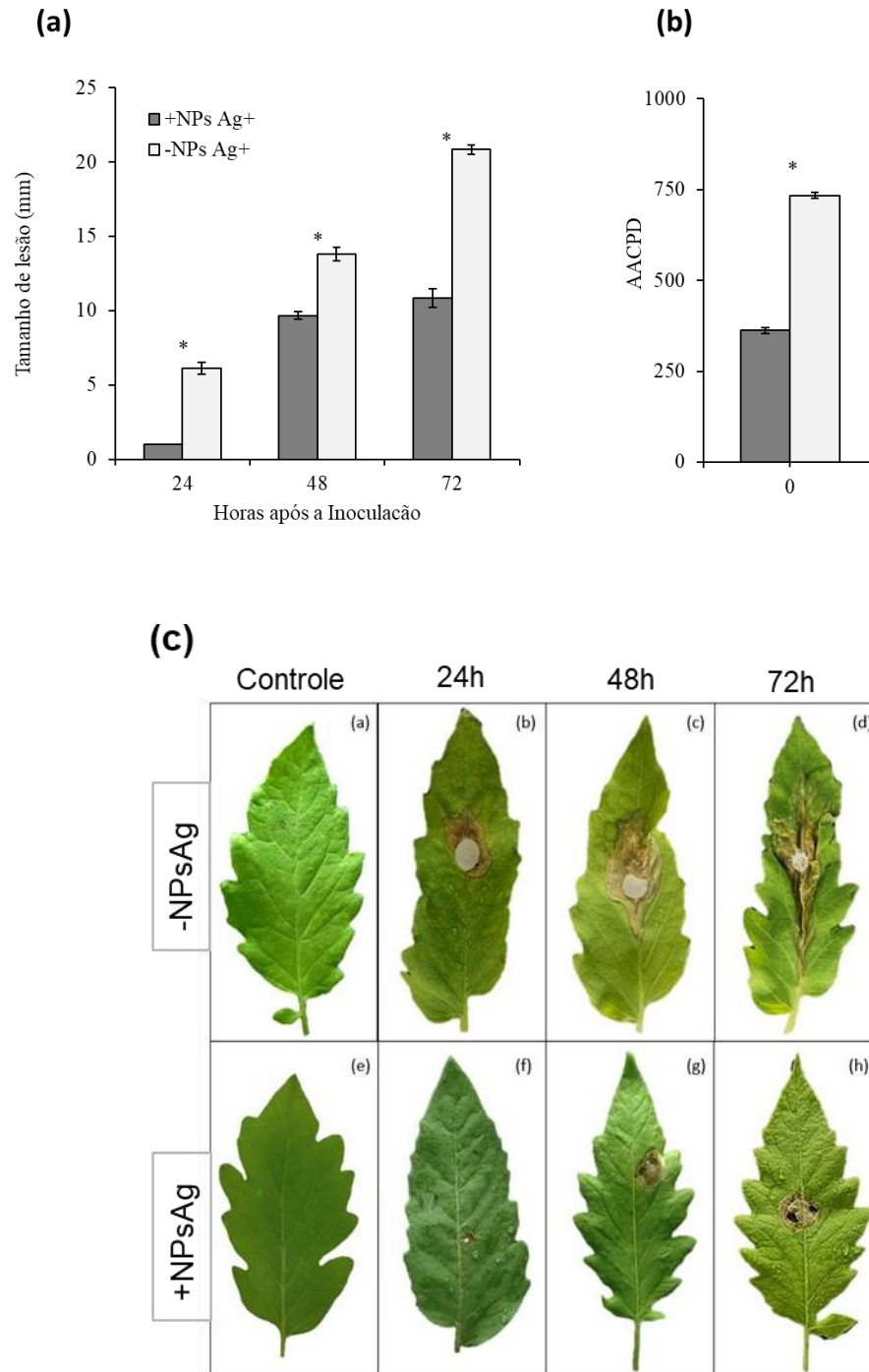


Figura 2. Tamanho da lesão (mm) (a), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (b), determinadas a partir de folhas de plantas de tomate tratadas ou não com Nanopartículas de Prata (+NPs Ag⁺ e -NPs Ag⁺, respectivamente) (c). As médias dos tratamentos que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de *t*. As barras representam os desvios padrão das médias.

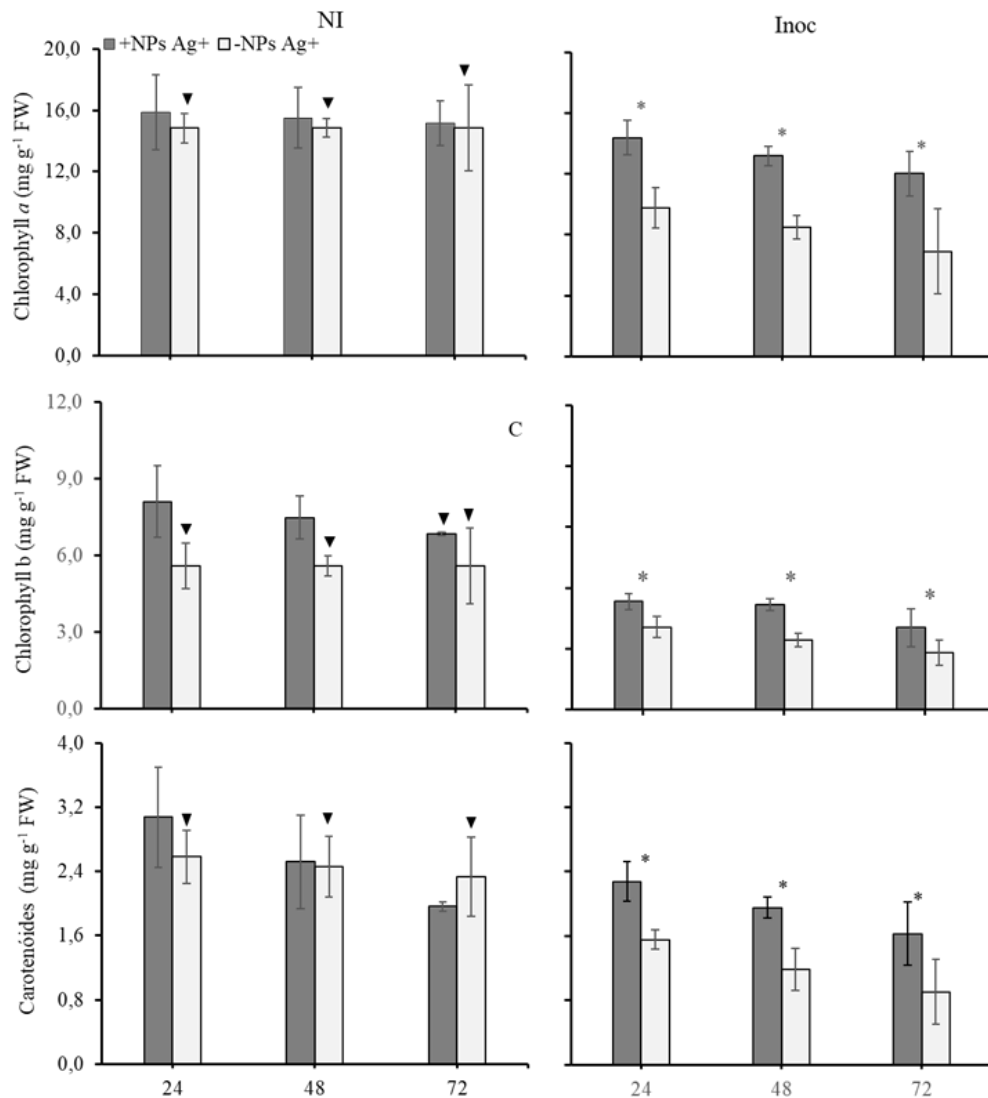


Figura 3. Concentração de clorofila Chl *a*, Chl *b* e carotenoides determinadas a partir de folhas de plantas de tomate tratadas ou não com Nanopartículas de Prata (+NPs Ag⁺ e -NPs Ag⁺, respectivamente). Plantas não inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *S. sclerotiorum*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de *t*. As médias dos tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

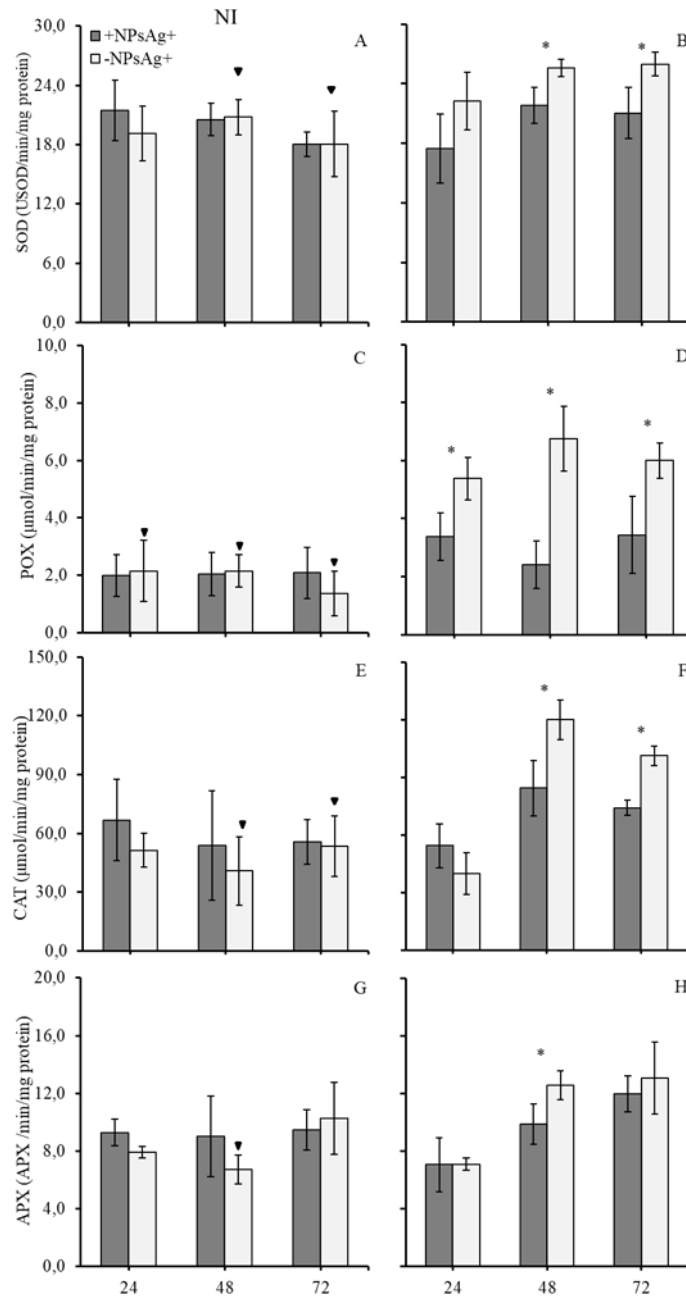


Figura 4. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D, catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz tratadas ou não com Nanopartículas de Prata (+NPs Ag⁺ e -NPs Ag⁺, respectivamente). Plantas não inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *S. sclerotiorum*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de *t*. As médias dos tratamentos não inoculados e inoculados dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

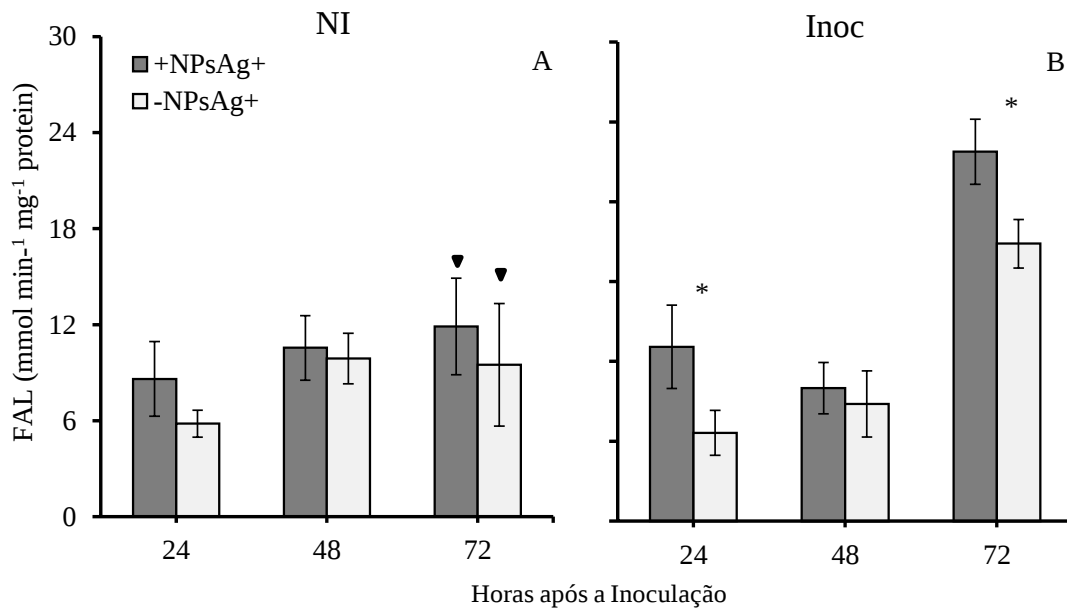


Figura 5. Atividades da fenilalanina amônia liase (FAL) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz tratadas ou não com Nanopartículas de Prata (+NPs Ag⁺ e -NPs Ag⁺, respectivamente). Plantas não inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *S. sclerotiorum*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste de *t*. As médias dos tratamentos não inoculado e inoculado dentro de cada tempo de avaliação que são seguidos pelo símbolo (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

1

2

3

4

5

6

7

8

9

CAPÍTULO III

10

CONCLUSÕES GERAIS

1

2 **CONCLUSÕES GERAIS**

3

4 As NPsAg⁺ apresentam potencial em inibir o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*
5 *in vitro*, demonstrando a seu efeito direto sobre o fungo;

6 A pulverização de NPsAg⁺ em folhas de tomateiro infectadas com *S. sclerotiorum* reduziu os
7 parâmetros epidemiológicos do mofo branco.

8 As NPsAg⁺, por reduzir os sintomas de mofo branco, permitem a preservação dos pigmentos
9 fotossintéticos e menor estresse oxidativo.

10 A maior atividade da FAL em folhas tratadas com NPsAg⁺ pode estar está associado a ativação
11 de rotas de defesa contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

12