



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de
Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por *Bipolaris
oryzae***

Larissa Cavalcante Almeida

Recife – PE

2023

Larissa Cavalcante Almeida

**Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de
Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por *Bipolaris*
*oryzae***

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Ribeiro Santiago

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)

- A447u Almeida, Larissa Cavalcante
Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por *Bipolaris oryzae* /
Larissa Cavalcante Almeida. - 2023.
90 f. : il.
- Orientador: Jonas Alberto Rios.
Coorientadora: Thais Ribeiro Santiago.
Inclui referências e apêndice(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, 2023.
1. Mancha parda. 2. *Oryza sativa*. 3. estresse hídrico. 4. nanotecnologia. I. Rios, Jonas Alberto, orient. II. Santiago,
Thais Ribeiro, coorient. III. Título

**Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de
Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por *Bipolaris
oryzae***

LARISSA CAVALCANTE ALMEIDA

Tese _____ e _____ pela Banca Examinadora em: ____/____/____

ORIENTADOR(A):

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza

Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Regis Pedrosa

Dr^a. Patrícia Ricardino da Silveira

Dr^a. Camila Cristina Lage de Andrade

**Recife – PE
2023**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu Deus pelo dom da vida e pelas faculdades físicas e mentais que me conduz no meio científico em busca constante por repostas.

A minha família por ser meu porto seguro e apoio incondicional. Minha avó Leopoldina Erlinda (*in memorian*), meu pai Severino Almeida (*in memorian*), meus irmãos Vanessa Almeida e Fabiano Almeida, minhas primas Camila Cavalcante e Amanda Cavalcante, meus sobrinhos Nicolas, Lavínia, Ravi e Bernardo. Em especial, a minha mãe, meu maior exemplo de força, determinação e coragem.

As minhas amigas Danielle Albuquerque e Iane Azevedo por se fazerem sempre presente.

André Siqueira por embarcar nas minhas problematizações e discussões de ideias e ideais, mas principalmente, por trazer leveza em meio ao caos dessa trajetória.

Aos companheiros de jornada, Jaqueline, Bruno, Jadson, Felipe, David, Erasmo, Roselane, Ana Flávia, Luciana, Bia, Cássia, Keyla, Wagner por compartilhar as humilhações diárias (aguardemos os dias de glória, irmãos).

Ao PPG Fitopatologia da UFRPE e todo corpo docente e administrativo que participou de forma direta ou indireta da minha formação, em especial ao meu orientador, Jonas Rios, exemplo de profissional.

Aqueles que colaboraram com o desenvolvimento desta pesquisa, Marta Cristina, pesquisadora na Embrapa Arroz e Feijão pela concessão das sementes, a professora Thaís Santiago (UNB) pela concessão das nanopartículas metálicas, ao professor Edivan Rodrigues pelo suporte nas análises fisiológicas da pesquisa, a clínica fitossanitária de Pernambuco (CLIFIPE) pela concessão do espaço e laboratório multiusuário no desenvolvimento da pesquisa.

A todas as mulheres que ousaram, lutaram, abriram
caminhos e me trouxeram até aqui.
Em especial, *Maria das Graças C. Almeida*,
mainha.
Dedico

“E vocês que estão sentados nesses bancos, representando a
esperança desse país, não venham aqui só pela excitação da
polêmica, mas apenas para aprender...
Não fiquem maravilhados diante do novo, nem assustados pelo
que ontem vos era desconhecido...
Não recuem diante do mistério, mas procurem enfrentá-lo e
desvendá-lo...
Não se considerem os únicos donos da verdade e do
conhecimento, pois um diploma não faz o cientista, o sábio...
Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo...
E façam tudo com amor, pois será um dia esplêndido aquele em
que, dos progressos da ciência, participará também o coração.”
Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO 1	13
Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por <i>Bipolaris oryzae</i>	14
1. Importância econômica e social da cultura do arroz	14
3. Estresse hídrico	17
4. Ocorrência simultânea de estresse biótico e abiótico.....	19
5. Uso de nanopartículas de prata como mitigador de estresse	22
CAPÍTULO II.....	31
Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Plantas de Arroz Pulverizadas com Nanopartículas de Prata e Infectadas com <i>Bipolaris oryzae</i>	31
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	36
2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	37
2.2.1. Material vegetal e condições de crescimento	37
2.2.2. Pulverização de NPsAg e inoculação com <i>B. oryzae</i>	38
2.2.3. Avaliação da mancha parda.....	38
2.2.4. Determinação dos parâmetros fisiológicos.....	39
2.2.4.1. Fluorescência da clorofila a (Chl <i>a</i>).....	39
2.2.4.2. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos.....	39
2.2.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	39
2.2.5.2. Determinação da atividade de enzimas de defesa.....	41
2.6. Delineamento experimental e análise estatística	41
3. RESULTADOS	41
3.1. Ensaio <i>in vitro</i>	41
3.2. Ensaio <i>in vivo</i>	42
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO III	58
Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos em Folhas de Plantas de Arroz sob Condições de Estresse hídrico Leve e Infectadas por <i>Bipolaris oryzae</i>.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	62

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Crescimento de Plantas	64
2.2. Estresse hídrico e inoculação com <i>B. oryzae</i>	64
2.3. Avaliação da mancha parda.....	65
2.4. Determinação dos parâmetros fisiológicos	65
2.4.1. Potencial hídrico foliar ou total da planta (ψ_w).....	65
2.4.2. Fluorescência da clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	65
2.4.3. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos	66
2.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos	66
2.5.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e defesa	66
2.5.2. Determinação do conteúdo relativo de Prolina.....	67
2.6. Delineamento experimental e análise estatística	68
3. RESULTADOS	68
REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO IV	89
CONCLUSÕES GERAIS	90

Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de Estresse em Plantas de Arroz Infectadas por *Bipolaris oryzae*

RESUMO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa terceira posição entre os cereais mais cultivados no mundo, assumindo um importante papel na segurança alimentar, sobretudo em países subdesenvolvidos. No entanto, diversos fatores bióticos e abióticos ocorrem simultaneamente em campo causando perdas substanciais de produção, a exemplo do estresse hídrico e da mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker. É imperativo compreender o efeito dessas interações nas plantas de arroz, bem como explorar novas abordagens ou estratégias mitigadoras. Este estudo teve como objetivos: i) avaliar o efeito de Nanopartículas de Prata (NPsAg) *in vitro* e *in vivo* sobre *B.oryzae* e a mancha parda do arroz (MP), ii) compreender as alterações decorrentes do estresse hídrico na infecção por *B. oryzae* em plantas de arroz, bem como o potencial de NPsAg no controle desta doença em plantas sob ambos os estresses combinados. Para avaliar o efeito de NPsAg sobre o desenvolvimento de *B. oryzae* foram realizados testes *in vitro* com diferentes concentrações diluídos em meio BDA (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$). A concentração com elevado potencial inibitório foi utilizada no ensaio *in vivo*, em condições de casa de vegetação para avaliar os efeitos epidemiológicos (número e tamanho de lesões, severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)), fisiológicos (fluorescência da clorofila (Chl) *a* e concentração de pigmentos fotossintéticos) e bioquímicos (atividades de enzimas do sistema antioxidativo (ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD)) e de defesa (fenilalanina amônia liase (FAL)) de plantas de arroz infectadas com *B. oryzae*. O delineamento usado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (Época de avaliação, Inoculação e Tratamento com NpsAg) com quatro repetições. Os tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle) e NPsAg (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). A inoculação com *B.oryzae* foi realizada 24 horas após a aplicação de NpsAg, utilizando a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} . Nos testes *in vitro*, os ajustes de regressão para o índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e germinação de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros à medida que as doses de NPsAg aumentaram, evidenciando efeito direto de NPsAg sobre *B. oryzae*. No ensaio *in vivo*, a pulverização de NPsAg nas plantas reduziu significativamente a intensidade da MP do arroz em comparação com o tratamento controle. Folhas de plantas tratadas com NPsAg, por apresentar menor severidade da MP, demonstraram maiores concentrações de Chl *a* e Chl *b*, além de maior eficiência quântica do fotossistema II. Adicionalmente, o menor dano celular devido ao baixo nível de sintomas em folhas de plantas tratadas com NPsAg resultou em menores atividades de SOD, CAT, POX e APX. Para as plantas tratadas com NPsAg, a atividade da FAL foi significativamente maior em comparação ao controle. Em conclusão, a capacidade fotossintética foi preservada em plantas tratadas com NPsAg. Houve uma menor atividade das enzimas sequestrantes de espécies reativas de oxigênio nas plantas com NPsAg em razão do menor nível de infecção celular. O aumento na atividade da FAL evidencia maior capacidade de ativação de rotas de defesa em plantas de arroz previamente tratadas com NPsAg. Para compreender as alterações decorrentes do estresse hídrico na infecção por *B. oryzae* em plantas de arroz, bem como o potencial NPsAg no controle desta doença em plantas sob ambos os estresses combinados, um experimento *in vivo* foi instalado em condições de casa de vegetação, avaliando os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos. O delineamento usado foi inteiramente

casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (Época de avaliação, Inoculação e Estresse Hídrico) com quatro repetições. Plantas de arroz foram submetidas ao estresse hídrico leve induzido por PEG6000. Após o estresse, as plantas voltaram a condição inicial para recuperação durante 24 horas e foram pulverizadas com NpsAg ($5 \mu\text{L L}^{-1}$), quando foram inoculadas com *B.oryzae*, utilizando a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} . Nosso estudo demonstrou que plantas submetidas a estresse hídrico apresentaram reduções nos sintomas da mancha parda do arroz. Por apresentar menor severidade, a funcionalidade do aparato fotossintético foi menos afetado nestas plantas, que mostraram maiores concentrações de Chl *a*, Chl *b* e carotenoides, além de maior eficiência quântica do fotossistema II nas plantas sob a combinação de estresses. O efeito do estresse hídrico reduziu significativamente o potencial hídrico das plantas não inoculadas e inoculadas pelo patógeno. As atividades de SOD e POX, além do teor de prolina aumentaram nas plantas sob infecção por *B. oryzae* com aumento superior nas plantas que foram submetidas previamente ao estresse hídrico. A atividade da FAL foi significativamente maior em plantas que foram submetidas ao estresse hídrico e inoculadas com *B. oryzae*. A pulverização foliar com NPsAg nas plantas submetidas as tensões combinadas reduziu significativamente o NL, TL, severidade e AACPD. Tomados em conjunto, o estresse hídrico combinado com MP levou ao aumento nos teores de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, além de maior atividade da FAL. Apesar de se ter o efeito de redução nos níveis de doença, o estresse hídrico isolado gera malefícios fisiológicos nas plantas, aqui denotado pelo menor potencial hídrico. O tratamento foliar com NPsAg reduziu os parâmetros epidemiológicos da MP do arroz em combinação com estresse hídrico, indicando potencial uso como mitigador de estresse.

Palavras-chave: Mancha parda, *Oryza sativa*, estresse hídrico, nanotecnologia

Use of Silver Nanoparticles as Stress Mitigator in Rice Plants Infected by *Bipolaris oryzae*

GENERAL ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) ranks third among the most cultivated cereals worldwide, playing a crucial role in food security, particularly in underdeveloped countries. However, various biotic and abiotic factors occur simultaneously in the field, causing substantial production losses, such as water stress and brown spot, caused by *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker. It is imperative to understand the effect of these interactions on rice plants and explore new approaches or mitigating strategies. This study aimed to: i) evaluate the effect of Silver Nanoparticles (AgNPs) *in vitro* and *in vivo* on *B. oryzae* and rice brown spot (BS), ii) understand the changes resulting from water stress in *B. oryzae* infection in rice plants, as well as the potential of AgNPs in controlling this disease in plants under both combined stresses. To evaluate the effect of AgNPs on the development of *B. oryzae*, *in vitro* tests were performed with different concentrations diluted in PDA medium (0, 5, 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{L L}^{-1}$). The concentration with high inhibitory potential was used in the *in vivo* assay, under greenhouse conditions, to evaluate epidemiological (number and size of lesions, severity, and area under the disease progress curve (AUDPC)), physiological (chlorophyll (Chl) *a* fluorescence and concentration of photosynthetic pigments), and biochemical effects (activities of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD)) and defense (phenylalanine ammonia-lyase (PAL)) in rice plants infected with *B. oryzae*. The experimental design used was completely randomized in a 2 x 2 x 2 factorial scheme (Evaluation time, Inoculation, and AgNPs Treatment) with four replications. The treatments used were: distilled water (control treatment) and AgNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). Inoculation with *B. oryzae* was performed 24 hours after AgNPs application, using a concentration of 1×10^5 conidia mL^{-1} . In the *in vitro* tests, regression adjustments for the mycelial growth rate index, mycelial diameter, and conidial germination of *B. oryzae* showed a reduction in these parameters as the doses of AgNPs increased, demonstrating a direct effect of AgNPs on *B. oryzae*. In the *in vivo* assay, AgNPs spraying on the plants significantly reduced the intensity of rice BS compared to the control treatment. Leaves of AgNPs-treated plants, due to lower BS severity, showed higher concentrations of Chl *a* and Chl *b*, as well as greater photosystem II quantum efficiency. Additionally, the lower cell damage due to the low level of symptoms in AgNPs-treated plants resulted in lower activities of SOD, CAT, POX, and APX. For AgNPs-treated plants, PAL activity was significantly higher compared to the control. In conclusion, the photosynthetic capacity was preserved in AgNPs-treated plants. There was a lower activity of reactive oxygen species scavenging enzymes in plants with AgNPs due to the lower level of cell infection. The increased PAL activity indicates a higher capacity for defense pathway activation in rice plants previously treated with AgNPs. To understand the changes resulting from drought stress in *B. oryzae* infection in rice plants, as well as the potential of AgNPs in controlling this disease in plants under both combined stresses, an *in vivo* experiment was conducted under greenhouse conditions, evaluating epidemiological, physiological, and biochemical parameters. The experimental design used was completely randomized in a 2 x 2 x 2 factorial scheme (Evaluation time, Inoculation, and Water Stress) with four replications. Rice plants were subjected to mild drought stress induced by PEG6000. After the stress period, the plants returned to their initial condition for 24 hours of recovery and were sprayed with AgNPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$), followed by inoculation with *B. oryzae* using a concentration of 1×10^5 conidia mL^{-1} . Our study demonstrated that plants subjected to drought stress showed reductions

in symptoms of rice brown spot. Due to lower severity, the functionality of the photosynthetic apparatus was less affected in these plants, which exhibited higher concentrations of Chl *a*, Chl *b*, and carotenoids, as well as greater quantum efficiency of photosystem II in plants under the combination of stresses. The effect of drought stress significantly reduced the water potential of both non-inoculated and pathogen-inoculated plants. The activities of SOD and POX, as well as the proline content, increased in plants under *B. oryzae* infection, with a higher increase in plants previously subjected to drought stress. The activity of PAL was significantly higher in plants subjected to drought stress and inoculated with *B. oryzae*. Foliar spraying with AgNPs in plants under combined stresses significantly reduced the number of lesions, lesion size, severity, and AUDPC. Taken together, water stress combined with rice brown spot led to increased levels of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, as well as higher PAL activity. Although there was a reduction in disease levels, isolated drought stress resulted in physiological harm to the plants, as indicated by the lower water potential. Foliar treatment with AgNPs reduced the epidemiological parameters of rice brown spot in combination with drought stress, indicating potential use as a stress mitigator.

Keywords: Brown spot, *Oryza sativa*, drought stress, nanotechnology

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Plantas de Arroz Submetidas a Estresse Hídrico e Infecção por *Bipolaris oryzae* e Uso de Nanopartículas de Prata como Mitigador de Estresse

1. Importância econômica e social da cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa terceira posição entre os grãos mais produzidos no mundo, atrás apenas do milho e do trigo (FAO, 2021). É um dos principais alimentos básicos consumidos por mais da metade da população mundial, fornecendo até 80% da ingestão diária de calorias de grande parte da população humana (SAHEBI *et al.*, 2018). A importância da cultura é ainda mais relevante em países subdesenvolvidos, podendo influenciar diretamente a renda, saúde, meio ambiente e bem-estar social. Por isso, organizações globais como o Consortium Of International Agricultural Research Centers (CGIAR) promovem o arroz para atender a 9 dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (<https://ricecrp.org/rice-and-the-sdgs/>).

Dos quase 660 milhões de toneladas produzidos no mundo, o Brasil se destaca como décimo maior produtor do cereal, sendo o único país fora do continente Asiático entre os 10 principais produtores (FAO, 2023). Na safra 2021/2022, a cultura ocupou uma área de aproximadamente 1.618.300 ha, atingindo uma produção de 10.783,5 mil ton, com produtividade média de 6.667 kg ha⁻¹. Entre os estados produtores, o Rio Grande do Sul detém pouco mais de 70% da produção nacional, seguido de Santa Catarina (10%), Tocantins (5%) e Mato Grosso (3%). Na região Nordeste, a produção alcançou 383.100 ton em uma área de 168.000 ha, sendo Maranhão e Piauí os principais produtores (CONAB, 2022a).

De acordo com a CONAB (2022b) houve uma redução de 9,9% na produção e 3,5% na área plantada em comparação a safra 2020/2021. Essa redução está associada a condições climáticas, além de elevação no preço dos insumos e boa perspectiva de rentabilidade de outras culturas que competem por área com o arroz, a exemplo da soja e do milho. No Nordeste, a redução foi ainda mais acentuada, isso porque na região predomina o cultivo de sequeiro, que teve a colheita fortemente afetada pelo excesso de precipitações, consequência do fenômeno La Niña. Atualmente, a previsão de produção para a safra 2022/2023 é de 10.757,2 mil ton, 0,3% menor que a safra 2021/2022, devido principalmente, as condições climáticas (CONAB, 2022c).

Fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade hídrica podem prejudicar a

germinação, o estabelecimento das mudas, o crescimento vegetativo, o início da floração, o crescimento da panícula, o enchimento dos grãos e a produtividade. No arroz, esses atributos comprometem severamente o estabelecimento e o crescimento da cultura, refletindo na qualidade dos grãos colhidos e produção (JEYASRI *et al.*, 2021; STEPHEN *et al.*, 2022). Um outro fator que pode limitar a produção da cultura é a incidência de doenças e pragas em todas as fases de desenvolvimento da planta com estimativas indicando perdas de até 30% da produção global (SAVARY *et al.*, 2019). Em todo mundo são registradas mais de 80 doenças ocorrendo em diferentes países.

No Brasil, as doenças que ocorrem são brusone *Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr, mancha parda (*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, mancha dos grãos (complexo de patógenos: *B. oryzae*, *Phoma sorghina*, *Alternaria padwickii*, *Pyricularia oryzae*, *Microdochium oryzae*, *Sarocladium oryzae*, diferentes espécies de *Drechslera*, *Curvularia* spp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* spp., *Coniothyrium* sp., *Epicocum* sp., *Phythomyces* sp. e *Chaetomium* sp., queima das glumelas (*Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & Van Kesteren), escaldadura (*Monographella albescens* (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth, mancha estreita (*Sphaerulina oryzina* K. Hara, falso carvão (*Ustilagoideia virens* (Cooke) Takahashi), carvão, carvão da folha (*Entyloma oryzae* Syd. & P. Syd.), queima da bainha (*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk, mancha da bainha (*Waitea circinata* Warcup & Talbot, mal do pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Sacc.) von Arx & D. Olivier), podridão da bainha (*Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawksworth, podridão do colmo (*Sclerotium oryzae* Cattaneo), ponta branca (*Aphelenchoides besseyi* Christie), nematoide das galhas (*Meloidogyne graminicola* Gold. & Bir.) e vírus do enrolamento das folhas (*Rice stripe necrosis virus* - RSNV) (SILVA-LOBO; FILIPPI, 2017).

Considerando a importância do arroz para a segurança alimentar e as projeções que apontam que a produção do cereal deve aumentar 40% até 2030, a fim de suprir a demanda crescente (KHUSH, 2005), é crucial considerar os fatores associados às mudanças climáticas, como a disponibilidade de água, que podem impactar a produção agrícola (MYERS *et al.*, 2017). Além disso, perdas significativas na produtividade decorrentes de ataques de pragas e patógenos agravam esses desafios, tornando urgente a necessidade de compreender e buscar soluções mitigadoras. A exemplo da mancha parda do arroz, uma das principais doenças que afetam a cultura e que pode se tornar mais frequente e severa (BARNWAL *et al.*, 2013; MIZOBUCHI *et al.*, 2016; SAVARY *et al.*, 2005).

2. Mancha Parda

A mancha parda do arroz, causada por *B. oryzae* (Teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (S.Ito & Kurib.) Dressler ex Dastur), é uma das principais doenças que afeta a cultura a nível mundial, comprometendo o rendimento e a qualidade dos grãos (OU, 1985; SUNDER; SINGH; AGARWAL, 2014). A propagação da doença contribuiu fortemente com duas grandes epidemias na Índia. A primeira delas, “The Krishna-Godavari delta” ocorrida entre 1918 e 1919, e a segunda, “A grande Fome de Bengala” em 1943, quando a queda na produção de até 90% causou a morte de milhões de pessoas que tinham o arroz como principal fonte de carboidrato (PADMANABHAN, 1973). No Brasil, a doença vem sendo relatada desde a década de 80, com prevalência em todos os estados produtores (PRABHU; BEDENDO, 1982).

A doença pode ocorrer em diferentes estádios do ciclo de vida da cultura, com perdas no rendimento de até 80% no número de grãos cheios por panícula, além de redução no peso dos grãos de até 30%, sob condições favoráveis, a depender da cultivar (PRABHU, LOPES, ZIMMERMANN, 1980). Os danos são decorrentes da redução na germinação de sementes, da morte de plântulas originadas de sementes infectadas, da redução da área foliar e da infecção dos grãos (OU, 1985).

A infecção inicial pode ocorrer através da germinação de sementes infectadas ou por conídios dispersos pelo vento provenientes de plantas doentes ou restos culturais. Após a deposição dos conídios sobre o hospedeiro, ocorre a germinação a partir da formação de um tubo germinativo no ápice das células apicais ou basais, por onde ocorre a secreção das toxinas ofiobiolinas A e B (terpenos C₂₅), causando a morte das células do parênquima (XIAO *et al.*, 1991). Formam-se, então, os apressórios, de onde se originam as hifas de infecção, as quais podem penetrar diretamente nas células da epiderme ou através dos estômatos (OU, 1985). As lesões se desenvolvem em torno de 18 horas após a inoculação (DALLAGNOL *et al.*, 2009).

Os sintomas podem ser observados nos coleóptilos, folhas, bainha, panículas e grãos, sendo mais proeminentes nas folhas e grãos. Lesões circulares ou ovais surgem nos coleóptilos, de coloração marrom, apresentando os mesmos sintomas nas primeiras folhas. Os sintomas típicos se manifestam nas folhas, durante ou logo após a fase de floração e, mais tarde, nas glumelas e nos grãos. Essas manchas são circulares, de coloração marrom, que inicialmente são pequenas e com o progresso da doença se tornam ovais, geralmente circundadas por bordas pardo-avermelhadas com o centro da lesão cinza ou esbranquiçado, onde pode se encontrar estruturas reprodutivas do patógeno (SILVA-LOBO; FILIPPI, 2017; SUNDER; SINGH; AGARWAL, 2014). Em alta severidade, as lesões coalescem e destroem completamente a

lâmina foliar (BRANTNER, 1995; DALLAGNOL *et al.*, 2009). Nos grãos infectados se observa manchas de cor marrom que podem ocupar toda superfície e atingir o endosperma (OU, 1985), formando grãos de baixa densidade ou gessados, que resultam em perdas na colheita ou no beneficiamento (SILVA-LOBO; FILIPPI, 2017; SOAVE *et al.*, 1984).

A mancha parda é favorecida por excesso de chuvas e por baixa luminosidade durante a formação dos grãos. Alta umidade e temperaturas entre 20 °C e 30 °C são condições ótimas para a infecção e desenvolvimento da doença. As espiguetas, logo após a emissão das panículas até a fase leitosa dos grãos, são mais suscetíveis. Solos deficientes em nutrientes, especialmente em potássio, manganês, sílica, ferro e cálcio, assim como deficiência ou excesso de nitrogênio, também contribuem para o avanço da doença (SILVA-LOBO; FILIPPI, 2017).

As estratégias de manejo para mancha parda envolvendo o controle genético são limitadas. Muito embora vários grupos de pesquisa em todo mundo tenham concentrado esforços na busca por fontes de resistência (MATSUMOTO *et al.*, 2017; MIZOBUCHI *et al.*, 2016; OTA *et al.*, 2021), só recentemente, a primeira variedade prática de arroz do mundo com resistência a *B. oryzae* foi desenvolvida no Japão (MATSUMOTO *et al.*, 2021). A variabilidade genética entre isolados do fungo é a principal dificuldade enfrentada no desenvolvimento de cultivares resistentes (AHMADPOUR *et al.*, 2018; BASAVARAJU; KUKANDHURU; HARISHCHANDRA, 2014).

Consequentemente, a utilização de fungicidas tem sido a principal estratégia para limitar as perdas de produtividade causadas pela doença. Entre as classes de fungicidas usados no controle da mancha parda estão os triazóis e as estrobilurinas devido sobretudo, as suas atividades sistêmicas de amplo espectro (DEBONA *et al.*, 2016). O tratamento químico em sementes tem se mostrado eficiente no controle da doença, onde o fungicida previne ou reduz o inóculo inicial da cultura devido à sua ação sobre *B. oryzae*, citado como principal agente de efeito deletério na emergência e na formação da plântula na cultura do arroz (PRABHU; VIEIRA, 1989).

3. Estresse hídrico

A seca é um fator climático caracterizado pela baixa ou falta de chuvas e ocorre em praticamente todas as regiões climáticas induzindo perdas de rendimento nas culturas (OLADOSU *et al.*, 2019). Com a mudança climática global interrompendo a regularidade e a magnitude dos eventos hidrológicos, a produção agrícola se torna mais vulnerável do que no passado, refletindo na segurança alimentar. A América Latina está entre as regiões mais

afetadas devido as suas características geográficas, como planaltos não delimitados e com diques e planícies rasas de sequeiro (RADHA *et al.*, 2023). Um estudo anterior usando dados de produtividade e metrológicos de 1980 a 2015 relatou a queda de produtividade de cereais como trigo e milho de até 21 e 40%, respectivamente, devido à seca em escala global (DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2016). Estimativas indicam que os eventos de estresse hídrico afetam frequentemente uma área de 27 milhões de hectares de arroz de sequeiro (RADHA *et al.*, 2023).

Em geral, a produção de arroz requer uma grande quantidade de água, atualmente estimada em 3.000 litros para produzir 1 kg de arroz (OLADOSU *et al.*, 2019). A cultura é sensível ao estresse hídrico em diferentes estágios fenológicos com prejuízos significativos no crescimento, desenvolvimento e rendimento. Por exemplo, estresse hídrico severo durante a fase reprodutiva reduziram a produção do arroz em até 70%, aumentando para até 88% durante a floração e 52% durante o enchimento dos grãos. O estresse hídrico no estágio de floração resultou em esforço incompleto da panícula, 30% de esterilidade de espiguetas e uma redução de 20 a 46% na formação de sementes (BAHUGUNA *et al.*, 2018). Além do rendimento do arroz, a qualidade do grão, medida principalmente pela aparência física do grão, conteúdo mineral, proporção de amido de amilose e amilopectina, aroma e qualidade de cozimento, também pode ser afetada pelo estresse hídrico (YANG *et al.*, 2019).

Geralmente, o estresse hídrico é medido por respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que são dependentes do nível de estresse e estágio fenológico da planta (YANG *et al.*, 2022). Entre os caracteres morfológicos se observam alterações no índice de área foliar, na altura da planta, comprimento da raiz e no número efetivo de panículas (ALOU *et al.*, 2018). O sintoma inicial do estresse hídrico nas plantas de arroz é o rolamento das folhas, que atua prevenindo, retardando ou inibindo a desidratação celular. A seca severa reduz a área foliar, a altura das plantas e o número de perfilhos ao inibir a expansão e divisão das células do mesófilo, levando a um declínio na fotossíntese e uma diminuição no acúmulo de material. Já as raízes aumentam em comprimento e densidade para promover a absorção de água. Durante a fase reprodutiva, os processos que envolvem a deiscência das anteras, viabilidade e germinação do pólen são afetados, levando a esterilidade das espiguetas. Nos estágios finais, a seca leva a senescência prematura das folhas, suprimento limitado de assimilados e consequente redução no acúmulo de matéria seca que é base para formação da produção (OLADOSU *et al.*, 2019; PRATHAP *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2022).

As alterações fisiológicas envolvem reduções na taxa fotossintética através de vários

aspectos. Um deles é a restrição estomática, onde o estresse causa o fechamento dos estômatos e reduz a condutância estomática, resultando na obstrução do suprimento de dióxido de carbono (CO_2). A outra razão é a restrição não estomática, onde o estresse inibe a fotossíntese afetando o fotossistema II (PSII) e a atividade de enzimas biossintéticas de amido e sacarose. Como consequência a redução da fotossíntese, há uma menor produção de fotoassimilados, que por sua vez, altera a relação fonte e dreno, prejudicando a partição e translocação de assimilados (XIONG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2022).

Além de reduções na fotossíntese, o fechamento estomático (ao reduzir a fixação de CO_2 e a regeneração de NADP^+) causa aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxila (OH^-) através do vazamento de elétrons para o oxigênio molecular durante as atividades de transporte de elétrons de cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas. A superprodução de EROs causa oxidação de pigmentos fotossintéticos, lipídios de membrana e proteínas levando plantas de arroz ao estresse oxidativo (NAHAR; SAHOO; TANTI, 2018; POSPÍŠIL, 2016).

Como organismos sésseis, as plantas desenvolveram inúmeras respostas adaptativas ao estresse hídrico que auxiliam sua sobrevivência. Os mecanismos de tolerância a seca incluem ajustes celulares, aclimação fisiológica e adaptações morfológicas que são controladas por fatores genéticos em diferentes estágios. Os ajustes celulares para tolerância à seca envolvem aumento do teor de clorofila, menor potencial osmótico e aumento no índice de colheita. A aclimação fisiológica compreende maior densidade e condutância estomática, redução nas taxas de transpiração, assincronia reduzida e precoce entre floração e maturação feminina e masculina, além de melhor produção, assimilação e repartição do rendimento de sementes e biomassa. Finalmente, as adaptações morfológicas incluem aumento da espessura e comprimento da raiz, coberturas cerosas e/ou espessas das folhas, diminuição do peso e tamanho das folhas, células epiteliais menores, atraso na senescência das folhas e aumento da área verde das folhas (BASU *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2023; MISHRA; PANDA, 2017; SAHEBI *et al.*, 2018).

4. Ocorrência simultânea de estresse biótico e abiótico

O impacto dos fatores ambientais nas doenças das plantas, popularmente conhecido como “triângulo das doenças”, sempre foi uma consideração importante para os fitopatologistas. Diversos estudos apontam para um aumento no número de combinações de

estresse abiótico e biótico em decorrência do aquecimento global e potenciais anormalidades associadas a ele (PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Portanto, para o desenvolvimento de plantas com melhor adaptação as condições de campo, o foco agora deve ser direcionado para compreensão das respostas das plantas sob condições de estresse combinado (JUROSZEK; VON TIEDEMANN, 2015; PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015).

Quando expostas a múltiplas condições de estresse, as plantas ativam respostas de estresse específicas e únicas (PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015; ZHANG; SONNEWALD, 2017). Isso porque as redes de sinalização de estresse abiótico e biótico das plantas consistem em várias vias de interação. Assim, diferentes condições de estresse levam a alguns processos fisiológicos e moleculares comuns nas plantas, além das respostas únicas (SUNARTI *et al.*, 2022). As respostas compartilhadas referem-se as respostas moleculares e fisiológicas que são comuns aos dois estresses diferentes e as respostas únicas são aquelas que são específicas para os estresses individuais ou as combinações de estresse (PANDEY *et al.*, 2017). Mecanismos compartilhados constituem uma parcela considerável da resposta das plantas a estresses individuais e combinados. Esses mecanismos incluem a expressão de genes induzidos por estresse que funcionam na tolerância ao estresse, ativação de cascatas de sinalização, produção de EROs e acúmulo de hormônios como ácido salicílico (AS), etileno (ET), ácido jasmônico (JA) e ácido abscísico (AB) (RAMEGOWDA *et al.*, 2013; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015).

Desse modo, a interação entre dois estresses pode ser aditiva ou antagônica entre si. Assim, um primeiro fator de estresse precedido por outro fator de estresse em sequência pode “perdurar” (devido ao priming) ou “predispor” as plantas ao estresse subsequente (PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Com base no número de relatos de doenças de plantas afetadas pelo estresse hídrico e na frequência de ocorrência do estresse hídrico, essa combinação pode ser considerada uma das mais importantes que afetam o rendimento das culturas em todo o mundo. Por exemplo, a podridão seca da raiz em *Cicer arietinum* (grão de bico) causada por *Rhizoctonia bataticola* é agravada em condições de estresse hídrico (SHARMA; PANDE, 2013). A interação entre o estresse hídrico e o fungo necrotrófico infectando plantas cultivadas em diferentes teores de umidade do solo mostrou que a doença foi mais severa em 40% de umidade do solo. A menor incidência de doenças em solo com alto teor de umidade foi atribuída a incapacidade dos escleródios fúngicos de sobreviver em condições de solo úmido. Essa interação também foi observada para podridão radicular em

Phaseolus vulgaris (feijão comum), onde se observou que além de afetar a sobrevivência dos microescleródios no solo, o déficit hídrico também afetou negativamente a fisiologia da planta, aumentando a taxa de transpiração e reduzindo o potencial hídrico, a resistência estomática, a área foliar e peso seco das estruturas vegetativas das plantas (MAYEK-PÉREZ *et al.*, 2002).

Em contraste com os relatos acima, estudos desenvolvidos em *Arabidopsis thaliana* sob estresse hídrico e infecção por *Pseudomonas syringae* demonstram efeitos positivos na imposição combinada. A doença se mostrou mais severa em plantas submetidas a estresse hídrico leve (80% da capacidade de campo) em comparação com as plantas sob estresse hídrico severo (20% CP). Além disso, a multiplicação do patógeno foi reduzida à medida que a severidade do estresse aumentou (GUPTA; DIXIT; SENTHIL-KUMAR, 2016). A redução da doença foi associada a redução no teor relativo de água nas folhas das plantas sob seca severa. Isso porque o estado de água na folha desempenha um papel fundamental na infecção bem-sucedida pelo patógeno. No momento da infecção, as plantas respondem a *P. syringae* pela inibição completa do movimento vascular da água e aumento na transpiração da água da folha, desta forma a planta restringiu a multiplicação de bactérias por falta de água. Além disso, a redução de água nos espaços apoplásticos em decorrência do estresse hídrico possivelmente induziu a defesa basal contra o patógeno (FREEMAN; BEATTIE, 2009; WRIGHT; BEATTIE; LINDOW, 2004).

Sugere-se que a adaptação da planta a qualquer situação de estresse seja medida por defesas basais e induzidas. A eficácia dessa resistência basal pode ser aumentada pela pré exposição das plantas a estímulos bióticos ou abióticos leves específicos antes de impor a força total do respectivo estresse (SUNARTI *et al.*, 2022). Por exemplo, relata-se que o estresse hídrico proporciona resistência a *Nicotiana benthamiana* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Pseudomonas syringae* (RAMEGOWDA *et al.*, 2013). No tomateiro a aclimação ao estresse reduz os níveis de infecção de *Botrytis cinerea* (agente causal do mofo cinzento) e *Oidium neolycopersici* (agente causal do oídio) (ACHUO; PRINSEN; HÖFTE, 2006).

Na videira, a tolerância ao estresse hídrico está associado a reposta imune a *B.cinerea*, que se torna menos suscetível a infecção sob condições de seca (HATMI *et al.*, 2015). Em alguns casos ainda, a infecção concomitante por patógenos ajuda as plantas a suportar o estresse hídrico, resultando em maior rendimento (AGUILAR *et al.*, 2017; CARR, 2017). Por exemplo, a infecção com o *Cucumber mosaic virus* (CMV) levou a uma melhor tolerância à seca de *Beta vulgaris* (beterraba), *Capsicum annum* (pimenta), *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis lanatus* (melancia), *C. sativus* (pepino), *Cucurbita pepo* (abobrinha), *Solanum*

lycopersicum (tomate), *S. habrochaites*, *N. benthamiana* e *N. tabacum* (tabaco) (XU *et al.*, 2008).

Considerando o papel dos fatores abióticos de estresse na determinação do rendimento das plantas, torna-se extremamente importante que o efeito das restrições bióticas também seja considerado, a fim de gerar uma projeção mais abrangente e relevante da produtividade global futura sob uma mudança de clima. Poucos estudos têm vinculado modelos de previsão de doenças a cenários climáticos regionais. Os realizados até o momento apontam para uma forte influência do aquecimento global na distribuição, incidência e severidade de doenças de plantas cultivadas (JUROSZEK *et al.*, 2022; JUROSZEK; VON TIEDEMANN, 2015). As previsões indicam que a mancha parda do arroz pode se tornar mais frequente e severa, sobretudo em condições de aumento da temperatura e restrição hídrica indicando expansão da área endêmica da doença em todo o mundo (BARNWAL *et al.*, 2013; MIZOBUCHI *et al.*, 2016; SAVARY *et al.*, 2005). Além disso, prevê-se que a área de cultivo de arroz exposta ao estresse hídrico duplique até o ano 2100 (IPCC, 2014). Esforços nessa direção ajudariam no planejamento de melhores estratégias para melhorar a produtividade das lavouras.

5. Uso de nanopartículas de prata como mitigador de estresse

Recentemente, nanopartículas metálicas têm sido amplamente estudadas, demonstrando potencial promissor para aplicações em diferentes áreas (CRUZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; UTREJA *et al.*, 2020). Na agricultura não tem sido diferente, e aplicações de nanomateriais na produção, processamento, armazenamento, embalagem e transporte de produtos agrícolas já foram relatadas (BAKER *et al.*, 2017; ROHOLLA MOUSAVI, 2011). Entre essas nanopartículas, as nanopartículas de prata (NPsAg) estão entre as mais estudadas devido a sua conhecida atividade antimicrobiana (AL-OTIBI *et al.*, 2021; BOCATE *et al.*, 2019; DANISH *et al.*, 2022; KANAUIYA *et al.*, 2020; KORA; MOUNIKA; JAGADEESHWAR, 2020; MISHRA *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana tem sido atribuída ao seu tamanho e alta relação superfície/volume, o que lhes permite interagir intimamente com as membranas microbianas e não apenas devido a liberação de íons metálicos em solução. Há pelo menos quatro mecanismos de ação antimicrobianas das NPsAg bem definidos, como adesão de NPsAg na superfícies da parede celular e membrana; penetração de NPsAg na superfície da parede celular e dano de estruturas intracelulares (mitocôndrias, vacúolos, ribossomos) e biomoléculas (proteínas, lipídios e DNA); toxicidade celular induzida por NPsAg e estresse oxidativo causado pela

geração de espécies reativas de oxigênio (EROs); e modulação de vias de transdução de sinais (DAKAL *et al.*, 2016).

Embora existam muitos mecanismos atribuídos a atividade antimicrobiana apresentada pelas nanopartículas, o dano ao DNA e a ruptura da parede celular são as causas mais comuns de morte celular (DAKAL *et al.*, 2016; MODENA *et al.*, 2019). As nanopartículas aderem a parede celular e a membrana celular devido a interações eletrostáticas, causando o rompimento da parede celular, que leva ao vazamento de macromoléculas ou alterações no transporte através das membranas, que então danifica o DNA das células, causando a morte celular (NAYANTARA; KAUR, 2018). Como observado por Matras *et al.* (2022) em imagens de microscopia eletrônica de transmissão ao estudar o efeito de NPsAg no controle *in vitro* de *Fusarium avenaceum* e *F. equiseti*. Ainda em estudos *in vitro*, Tarazona *et al.* (2019) relataram que além de inibição no crescimento de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum*, também se observou redução na biossíntese de micotoxinas associadas a essas espécies.

Adicionalmente aos mecanismos citados acima, em bactérias fitopatogênicas, a atividade antimicrobiana de NPsAg também tem sido atribuída a inibição na formação do biofilme bacteriano e na motilidade natatória, importantes fatores na patogênese. De fato, essa associação foi reportada por Ibrahim *et al.* (2019a) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de NPsAg sobre *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Acidovorax oryzae*, agente etiológico da mancha bacteriana da folha e da listra marrom bacteriana do arroz, respectivamente.

O potencial de NPsAg *in vivo* também tem sido amplamente estudado, a exemplo de cercosporiose do cafeeiro, causada por *Cercospora coffeicola* (CARVALHO *et al.*, 2022). O trabalho mostra que mudas de cafeeiro tratadas com NPsAg (500 mg L⁻¹) apresentaram redução de 58% na severidade da doença em relação a testemunha. Supressão total foi relatada para podridão do colo, causada por *Sclerotium rolfsii*, em mudas de grão de bico, onde nenhum sintoma característico da doença se desenvolveu no local de infecção (MISHRA *et al.*, 2017). No controle de doenças do arroz, seu potencial já foi relatado para *Aspergillus flavus* (EJAZ *et al.*, 2018), *X. oryzae* (MISHRA *et al.*, 2020; NAMBURI *et al.*, 2021; AHMED *et al.*, 2020), *A. oryzae* (IBRAHIM *et al.*, 2019) e *Rhizoctonia solani* (KORA; MOUNIKA; JAGADEESHWAR, 2020).

Além da atividade antimicrobiana, NPsAg também têm o potencial de desencadear o crescimento de plantas, de estimular o metabolismo secundário com aumento na produção de

fenólicos e flavonóides, ácidos graxos e lipídeos, além de melhorar parâmetros morfológicos, como comprimento da parte aérea, floração e produção de sementes (AHMED *et al.*, 2021; BATOOL *et al.*, 2021). Por exemplo, o tratamento de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) em combinação com aplicação foliar de NPsAg em plantas melhorou os atributos bioquímicos e fisiológicos das plantas, o que por sua vez melhorou os parâmetros agromorfológicos, incluindo melhora na qualidade das sementes, teores de óleo e composição de ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico) (BATOOL *et al.*, 2021). Em arroz jasmim (*O. sativa* L. cv. KDML 105), o tratamento de sementes com NPsAg elevou o percentual de germinação e o vigor. Além disso, analisando uma fase seguinte, houve aumento no comprimento das raízes e brotos das plantas. Esse efeito positivo foi relacionado à melhora da absorção de água, suportado em nível molecular, uma vez que a expressão das aquaporinas PIP1 e PIP2 foi regulada positivamente (MAHAKHAM *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de desvendar o efeito de NPsAg na mitigação de estresses tanto bióticos, quanto abióticos. Algumas aplicações estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos da aplicação de NPsAg na mitigação de estresse biótico e abiótico em plantas cultivadas.

Patógeno	Cultura estudada	Tipo de estudo	Resultado	Referência
<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Atividade bactericida, fungicida e nematocida <i>in vitro</i> , além de supressão das doenças <i>in vivo</i> .	(DANISH <i>et al.</i> , 2022)
<i>B. sorokiniana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Atividade fungicida <i>in vitro</i> e redução na infecção nas plantas.	(MISHRA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Alternaria alternata</i> , <i>Curcularia lunata</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Atividade fungicida <i>in vitro</i> e controle da podridão do colarinho nas plantas.	(MISHRA <i>et al.</i> , 2017b)
-	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>In vivo</i>	Tolerância a estresse térmico	(IQBAL <i>et al.</i> , 2019)
-	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>In vivo</i>	Tolerância a seca e melhora no rendimento	(AHMED <i>et al.</i> , 2021)
-	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>In vivo</i>	Impacto atenuante no estresse UV-B e melhora no crescimento e o rendimento das plantas.	AZADI <i>et al.</i> , 2021

Portanto, o objetivo do presente estudo foi *i*) avaliar o efeito de Nanopartículas de Prata (NPsAg) *in vitro* e *in vivo* sobre *B. oryzae* e a mancha parda do arroz (MP), *ii*) compreender as alterações decorrentes do estresse hídrico na infecção por *B. oryzae* em plantas de arroz, *iii*) bem como o potencial NPsAg no controle desta doença em plantas sob ambos os estresses combinados.

REFERÊNCIAS

- ACHUO, E. A.; PRINSEN, E.; HÖFTE, M. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 178–186, 2006.
- AGUILAR, E. *et al.* Virulence determines beneficial trade-offs in the response of virus-infected plants to drought via induction of salicylic acid. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 12, p. 2909–2930, 2017.
- AHMADPOUR, A. *et al.* Population structure, genetic diversity, and sexual state of the rice brown spot pathogen *Bipolaris oryzae* from three Asian countries. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 181–192, 2018.
- AHMED, F. *et al.* Applications of copper and silver nanoparticles on wheat plants to induce drought tolerance and increase yield. **IET Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 68–78, 2021.
- AHMED, T. *et al.* Silver nanoparticles synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice. **Pathogens**, v. 9, n. 3, 2020.
- AL-OTIBI, F. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Malva parviflora* and their antifungal activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2229–2235, 2021.
- ALOU, I. N. *et al.* Growth, phenological, and yield response of upland rice (*Oryza sativa* L. cv. Nerica 4®) to water stress during different growth stages. **Agricultural Water Management**, v. 198, p. 39–52, 2018.
- AZADI, M. *et al.* Biosynthesized silver nanoparticles ameliorate yield, leaf photosynthetic pigments, and essential oil composition of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) exposed to UV-B stress. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105919, 2021.
- BAHUGUNA, R. N. *et al.* Mild preflowering drought priming improves stress defences, assimilation and sink strength in rice under severe terminal drought. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 8, p. 827–839, 2018.
- BAKER, S. *et al.* Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 10–17, 2017.
- BARNWAL, M. K. *et al.* A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, p. 443–457, 2013.
- BASAVARAJU, A.; KUKANDHURU, R. K.; HARISHCHANDRA, S. P. Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 238–244, 2014.
- BASU, S. *et al.* Comprehensive physiological analyses and reactive oxygen species profiling in drought tolerant rice genotypes under salinity stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 4, p. 837–850, 2017.
- BATOOL, S. U. *et al.* Exogenous Applications of Bio-fabricated Silver Nanoparticles to Improve Biochemical, Antioxidant, Fatty Acid and Secondary Metabolite Contents of Sunflower. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, p. 1750, 2021.
- BOCATE, K. P. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 79–86, 2019.
- BRANTNER, J. R. Survival, inoculum sources, and propiconazole sensitivity of *Bipolaris* species causing fungal brown spot of wild rice and host sensitivity to ophiobolin. 1995. 62f. Tese. University of Minnesota.
- CARR, J. P. Exploring how viruses enhance plants' resilience to drought and the limits to this form of viral payback. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 12, p. 2906–2908, 2017.
- 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, 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Arroz -Safras 2021/22 e 2022/23. Comparativo de área, produtividade e produção. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>> Acesso em: 30/11/2022a

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 9 nono levantamento, junho 2022b.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 1º primeiro levantamento, outubro 2022c.

CRUZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Current progress of Pt-based ORR electrocatalysts for PEMFCs: An integrated view combining theory and experiment. **Materials Today Physics**, v. 19, p. 100406, 2021.

DAKAL, T. C. *et al.* Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1831, 2016.

DALLAGNOL, L. J. *et al.* Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 116–121, 2009.

DANISH, M. *et al.* Nano-pesticidal potential of *Cassia fistula* (L.) leaf synthesized silver nanoparticles (Ag@CfL-NPs): Deciphering the phytopathogenic inhibition and growth augmentation in *Solanum lycopersicum* (L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156362, 2016.

DEBONA, D. *et al.* Physiological changes promoted by a strobilurin fungicide in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 8–16, 1 jun. 2016.

EJAZ, M. *et al.* Effect of silver nanoparticles and silver nitrate on growth of rice under biotic stress. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 7, p. 927–932, 2018.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) FAOSTAT: Countries by commodity. Rome: FAO, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity> Acesso: em 10/04/2023

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. Bacterial Growth Restriction During Host Resistance to *Pseudomonas syringae* Is Associated with Leaf Water Loss and Localized Cessation of Vascular Activity in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 7, p. 857–867, 2009.

GOUDARZI, A.; BANIHASHEMI, Z.; MAFTOUN, M. Effect of salt and water stress on root infection by *Macrophomina phaseolina* and ion composition in shoot in sorghum. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 69-83, 2011.

GUPTA, A.; DIXIT, S. K.; SENTHIL-KUMAR, M. Drought stress predominantly endures *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 808, 2016.

HATMI, S. *et al.* Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 775–787, 2015.

IBRAHIM, E. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. **RSC Advances**, v. 9, n. 50, p. 29293–29299, 2019.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). Impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: Global and sectoral aspects. In: Contribution of Working Group II to the fifth assessment report of the IPCC. Cambridge University Press, Cambridge, 2014.

IQBAL, M. *et al.* Assessment of AgNPs exposure on physiological and biochemical changes and antioxidative defence system in wheat (*Triticum aestivum* L.) under heat stress. **IET Nanobiotechnology**, v. 13, n. 2, p. 230–

236, 2019.

JEYASRI, R. *et al.* An overview of abiotic stress in cereal crops: Negative impacts, regulation, biotechnology and integrated omics. *Plants*, v. 10, n. 7, p. 1472, 2021.

JUROSZEK, P.; VON TIEDEMANN, A. Linking plant disease models to climate change scenarios to project future risks of crop diseases: a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 122, p. 3-15, 2015.

JUROSZEK, P. *et al.* Summary of the worldwide available crop disease risk simulation studies that were driven by climate change scenarios and published during the past 20 years. **Plant Pathology**, v. 71, n. 9, p. 1815-1838, 2022.

KANAUJIYA, D. *et al.* Photobiosynthesis of Silver Nanoparticle Using Extract of *Aspergillus flavus* CR500: Its Characterization, Antifungal Activity and Mechanism Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Journal of Cluster Science**, v. 31, n. 5, p. 1041–1050, 2020.

KHUSH, G. S. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 1–6, 2005.

KORA, A. J.; MOUNIKA, J.; JAGADEESHWAR, R. Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An *in vitro* fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. **Fungal Biology**, v. 124, n. 7, p. 671–681, 2020.

KUMAR, S. *et al.* Redox imbalance disrupts spikelet fertility in rice: A study under stage-specific and multi-stage drought in eastern Indo-Gangetic plain. **Environmental and Experimental Botany**, v. 205, p. 105121, 2023.

DALLAGNOL, L.J. *et al.* Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Australasian Plant Pathology**, v. 40, p. 360–365, 2011.

MAHAKHAM, W. *et al.* Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8263, 2017.

MATRAS, E. *et al.* Surface properties-dependent antifungal activity of silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18046, 2022.

MATSUMOTO, K. *et al.* Breeding and characterization of the world's first practical rice variety with resistance to brown spot (*Bipolaris oryzae*) bred using marker-assisted selection. **Breeding Science**, v. 71, n. 4, p. 474–483, 2021.

MATSUMOTO, K. *et al.* Identification of QTLs for rice brown spot resistance in backcross inbred lines derived from a cross between Koshihikari and CH45. **Breeding Science**, v. 67, n. 5, p. 540-543, 2017.

MAYEK-PÉREZ, N. *et al.* Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, n. 4, p. 185-195, 2002.

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, p. e97881, 2014.

MISHRA, S. *et al.* Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

MISHRA, S. S.; PANDA, D. Leaf Traits and Antioxidant Defense for Drought Tolerance During Early Growth Stage in Some Popular Traditional Rice Landraces from Koraput, India. **Rice Science**, v. 24, n. 4, p. 207–217, 2017.

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 Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 1-20, 2020.

MIZOBUCHI, R. *et al.* QTLs for Resistance to Major Rice Diseases Exacerbated by Global Warming: Brown Spot, Bacterial Seedling Rot, and Bacterial Grain Rot. **Rice**, v. 9, n.1, p. 1-12, 2016.

MODENA, M. M. *et al.* **Nanoparticle Characterization: What to Measure?** **Advanced Materials**, v. 31, n. 32, p. 1901556, 2019.

MYERS, S. S. *et al.* Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. **Annual Review of Public Health**, v. 38, p. 259–277, 2017.

NAHAR, S.; SAHOO, L.; TANTI, B. Screening of drought tolerant rice through morpho-physiological and biochemical approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 150–159, 2018.

NAYANTARA; KAUR, P. Biosynthesis of nanoparticles using eco-friendly factories and their role in plant pathogenicity: a review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 63–73, 2018.

OLADOSU, Y. *et al.* Drought Resistance in Rice from Conventional to Molecular Breeding: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3519, 2019.

OTA, Y. *et al.* QTL analysis for brown spot resistance in American rice cultivar ‘Dawn’. **Breeding Science**, v. 71, n. 4, p. 491–495, 2021.

OU, S. H. **Rice Diseases**, Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, UK, 1985

PADMANABHAN, S. Y. The great Bengal famine. **Annual Review of Phytopathology**, v. 11, p. 11-24, 1973.

PANDEY, P. *et al.* Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 537, 2017.

PANDEY, P.; RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: Physiological and molecular mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 723, 2015.

POSPÍŠIL, P. Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1950, 2016.

PRABHU, A. S., LOPES, A. M., ZIMMERMANN, F. J. P. Infecção da folha e do grão de arroz por *Helminthosporium oryzae* e seus efeitos sobre os componentes de produção. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 183-189, 1980.

PRABHU, A. S.; BEDENDO, I. P. Principais doenças do arroz no Brasil. Goiânia, EMBRAPA/CNPAP, 1982. 31p. (EMBRAPA/CNPAP. Documentos, 2)

PRABHU, A. S.; VIEIRA, N. R. A. Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle. **Embrapa Arroz e Feijão-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 1989.

PRATHAP, V. *et al.* Starch accumulation in rice grains subjected to drought during grain filling stage. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 142, p. 440-451, 2019.

RADHA, B. *et al.* Physiological and molecular implications of multiple abiotic stresses on yield and quality of rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 996514, 2023.

RAMEGOWDA, V. *et al.* Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9497–9513, 2013.

RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 47-54, 2015.

- MOUSAVI, S. R. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 1, n. 10, p. 414-419, 2011.
- SAHEBI, M. *et al.* Improvement of Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.): Genetics, Genomic Tools, and the WRKY Gene Family. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3158474, 2018.
- SAVARY, S. *et al.* Multiple effects of two drivers of agricultural change, labour shortage and water scarcity, on rice pest profiles in tropical Asia. **Field Crops Research**, v. 91, n. 2–3, p. 263–271, 2005.
- SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.
- SHARMA, M.; PANDE, S. Unravelling Effects of Temperature and Soil Moisture Stress Response on Development of Dry Root Rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.)] Butler in Chickpea. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 3, p. 584–589, 2013.
- SILVA-LOBO, V. L., FILIPPI, M. C. C. Manual de identificação de doenças da cultura do arroz. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. 45p.
- SOAVE, J. *et al.* Selection of rice cultivars resistant to some pathogens using seed health testing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 449-453, 1984.
- STEPHEN, K. *et al.* Changes in physiological traits and expression of key genes involved in sugar signaling pathway in rice under high temperature stress. **3 Biotech**, v. 12, n. 9, p. 183, 2022.
- SUNARTI, S. *et al.* Drought Stress Interacts With Powdery Mildew Infection in Tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 845379, 2022.
- SUNDER, S.; SINGH, R.; AGARWAL, R. Brown spot of rice: an overview History and economic importance. **Indian Phytopathology**, v. 67, n. 3, p. 201-215, 2014.
- 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, p. 108259, 2019.
- TULLIS, E. C. Histological studies of rice leaves infected with *Helminthosporium oryzae*. **Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 82-90, 1935.
- UTREJA, P. *et al.* Use of Nanoparticles in Medicine. **Current Biochemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 7–24, 2020.
- WRIGHT, C. A.; BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. *Pseudomonas syringae* pv. tomato cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3269-3274, 2004.
- XIAO, J. Z. *et al.* Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. **Phytopathology**, v. 81, n. 1, p. 58-64, 1991.
- XIONG, D. *et al.* Meta-analysis and dose-response analysis of high temperature effects on rice yield and quality. **Environmental and Experimental Botany**, v. 141, p. 1–9, 2017.
- XU, P. *et al.* Virus infection improves drought tolerance. **New Phytologist**, v. 180, n. 4, p. 911–921, 2008.
- YANG, X. *et al.* The different influences of drought stress at the flowering stage on rice physiological traits, grain yield, and quality. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3742, 2019.
- YANG, Y. *et al.* Enhancement of Heat and Drought Stress Tolerance in Rice by Genetic Manipulation: A Systematic Review. **Rice**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2022.
- ZHANG, H.; SONNEWALD, U. Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 839–855, 2017.

CAPÍTULO II

Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Plantas de Arroz Pulverizadas com Nanopartículas de Prata e Infectadas com *Bipolaris oryzae*

**Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Plantas de Arroz Pulverizadas com
Nanopartículas de Prata e Infectadas com *Bipolaris oryzae***

Larissa Cavalcante Almeida¹, Felipe Araujo Souza¹, 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

A mancha parda (MP), causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito e Kuribayashi)], causa grandes perdas em todas as regiões produtoras de arroz no mundo. O presente estudo objetivou avaliar o efeito de Nanopartículas de Prata (NPsAg) sobre essa doença. Primeiramente, testes *in vitro* foram realizados para verificar o desenvolvimento de *B. oryzae* com doses crescentes de NPsAg. Posteriormente um experimento *in vivo* foi instalado em condições de casa de vegetação para avaliar os efeitos epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos de plantas de arroz previamente tratada com NPsAg e infectadas com *B. oryzae*. O delineamento usado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (Época de avaliação, Inoculação e Tratamento com NpsAg) com quatro repetições. Os tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle) e NPsAg (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). A inoculação com *B.oryzae* foi realizada 24 horas após a aplicação NPsAg utilizando a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} . Foram avaliados número e tamanho de lesões, severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), fluorescência da clorofila (Chl) *a* e concentração de pigmentos fotossintéticos, atividades de enzimas do sistema antioxidativo (ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e de defesa (fenilalanina amônia liase (FAL)). Nos testes *in vitro*, os ajustes de regressão para o índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e germinação de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida que as doses de NPsAg aumentaram, evidenciando um efeito direto de NPsAg sobre a *B. oryzae*. No ensaio *in vivo*, a pulverização de NPsAg nas plantas reduziu significativamente a intensidade da MP do arroz em comparação com o tratamento controle. Folhas de plantas tratadas com NPsAg, por apresentar menor severidade da MP, demonstraram maiores concentrações de Chl *a* e Chl *b*, além de maior eficiência quântica do fotossistema II. Adicionalmente, o menor dano celular devido ao baixo nível de sintomas em folhas de plantas tratadas com NPsAg resultou em menores atividades de SOD, CAT, POX e APX. Para as plantas tratadas com NPsAg, a atividade da FAL foi significativamente maior em comparação ao controle. Concluindo-se que a capacidade fotossintética foi preservada em plantas tratadas com NPsAg. Houve uma menor atividade das enzimas sequestrantes de espécies reativas de oxigênio nas plantas com NPsAg em razão do menor nível de infecção celular. A maior atividade da FAL evidencia uma maior capacidade de ativação de rotas de defesa em plantas de arroz previamente tratadas com NPsAg.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae*, nanotecnologia, atividade antifúngica

ABSTRACT

The brown spot (BS), caused by the fungus *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorph: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito and Kuribayashi)], causes significant losses in rice-producing regions worldwide. This study aimed to evaluate the effect of Silver Nanoparticles (AgNPs) on this disease. Initially, *in vitro* tests were conducted to assess the development of *B. oryzae* with increasing doses of NPsAg. Subsequently, an *in vivo* experiment was conducted under greenhouse conditions to evaluate the epidemiological, physiological, and biochemical effects on rice plants previously treated with NPsAg and infected with *B. oryzae*. The experimental design used was completely randomized in a 2 x 2 x 2 factorial scheme (Evaluation Time, Inoculation, and AgNPs Treatment) with four repetitions. The treatments used were distilled water (control treatment) and Ag NPs (5 $\mu\text{L L}^{-1}$). Inoculation with *B. oryzae* was performed 24 hours after the application of AgNPs using a concentration of 1×10^5 conidia mL^{-1} . The number and size of lesions, severity, and area under the disease progress curve (AUDPC), chlorophyll (Chl) *a* fluorescence and concentration of photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD)), and defense enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL) were evaluated. In the *in vitro* tests, regression adjustments for the mycelial growth rate index, mycelial diameter, and conidial germination of *B. oryzae* showed a reduction in these parameters as the doses of NPsAg increased, indicating a direct effect of AgNPs on *B. oryzae*. In the *in vivo* assay, the foliar spray of AgNPs significantly reduced the intensity of rice BS compared to the control treatment. Leaves of AgNPs-treated plants, due to lower BS severity, showed higher concentrations of Chl *a* and Chl *b*, as well as higher quantum efficiency of photosystem II. Additionally, the lower cellular damage due to the low symptom level in AgNPs-treated plant leaves resulted in lower activities of SOD, CAT, POX, and APX. For AgNPs-treated plants, PAL activity was significantly higher compared to the control. In conclusion, the photosynthetic capacity was preserved in AgNPs-treated plants. There was lower activity of reactive oxygen species-scavenging enzymes in AgNPs-treated plants due to the lower level of cellular infection. The increased PAL activity indicates a greater capacity for defense pathway activation in rice plants previously treated with AgNPs.

Keywords: *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae*, nanotechnology, antifungal activity

1. INTRODUÇÃO

Os cereais são uma importante fonte de alimento em todo o mundo, sendo destaque devido aos seus diferentes aspectos nutricionais (FAO 2021). Particularmente, o arroz destaca-se por apresentar uma fonte diária de carboidratos, vitaminas e proteínas (FAO 2021; Khush 2005). Recentes estimativas demonstraram que o arroz é o terceiro cereal mais cultivado, com produção anual global superior a 640 milhões de toneladas (FAO 2021). Entretanto, para suprir a elevada demanda mundial e garantir a segurança alimentar, será necessário elevar a produção em 40% até 2030 (FAO 2021; Khush 2005). Diversos fatores podem comprometer a produção do arroz, a exemplo de pragas e doenças que incidem na cultura, causando perdas substanciais de produtividade sob condições climáticas variadas, sendo globalmente estimadas em 30% (Savary et al. 2019).

A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker, é uma das doenças de maior importância na cultura e está amplamente distribuída nas regiões produtoras de arroz em todo o mundo, sendo particularmente importante nas regiões tropicais (Ou 1972). A mancha parda pode afetar negativamente a qualidade e a produtividade de grãos, podendo esta ser reduzida em até 74% (Kohls et al. 1987). Após deposição sobre a superfície da folha de arroz, os conídios germinam e secretam toxinas não seletivas, como as ofiobolinas A e B, que contribuem para o desenvolvimento de sintomas (Xiao et al. 1991). Os sintomas característicos da mancha parda são lesões castanho-avermelhado circundado por um halo amarelo e com um centro cinza (Ou 1985; Dallagnol et al. 2011).

As estratégias de manejo para mancha parda são limitadas, sendo recomendado o controle genético e, principalmente, a aplicação de fungicidas (Debona et al. 2016). Contudo, o uso contínuo de fungicidas convencionais representa um risco para o meio ambiente e a segurança alimentar, razão pela qual um número crescente de ingredientes ativos em fungicidas está sendo eliminado (Malandrakis et al. 2020). Para superar esses obstáculos, surge a necessidade de se explorar novas abordagens ou estratégias de manejo da mancha parda.

O uso da nanotecnologia tem se mostrado como o potencial estratégia de controle de doenças na agricultura contra fitopatógenos. Em destaque surge o uso de nanopartículas metálicas, especialmente no controle de doenças de plantas, com particular interesse as nanopartículas de prata (NPsAg), devido as suas propriedades de ação antimicrobiana (Cruz-Luna et al. 2021). As NPsAg afetam negativamente a estrutura da membrana celular, como resultado da interrupção do transporte de elétrons e do metabolismo celular de organelas importantes para a célula. Além disso, as NPsAg danificam o DNA, inibem a síntese de

1 proteínas relacionadas à produção de ATP e podem gerar a produção de espécies reativas de
2 oxigênio, que causam estresse oxidativo e, consequentemente, inibem a proliferação celular
3 (Rajan et al. 2015; Dakal et al. 2016; Nayantara e Kaur 2018; Modena et al. 2019; Nisar et al.
4 2019)

5 Numerosos estudos relatam a aplicação bem-sucedida e eficiente de NPsAg no controle
6 de uma ampla gama de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Por exemplo, o
7 crescimento de *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*,
8 *Curvularia lunata* e *Bipolaris sorokiniana* foi significativamente inibido na presença de NPsAg
9 em testes conduzidos *in vitro* (Bahrami-Teimoori et al. 2017; Mishra et al. 2017). Resultados
10 obtidos em ensaios *in vivo* também apresentaram potencial de controle de NPsAg para mancha
11 foliar no trigo causada por *B. sorokiniana*, e podridão do colo no grão de bico causada por
12 *Sclerotium rolfsii* (Mishra et al. 2014, 2017).

13 Apesar do elevado número de trabalhos envolvendo a aplicação de NPsAg para o
14 controle de doenças em plantas, o seu efeito em plantas de arroz infectadas por *B. oryzae* ainda
15 não foi investigado. Trabalhamos com a hipótese que o tratamento com NPsAg pode controlar
16 a mancha parda em plantas de arroz, reduzindo os danos fotossintéticos e oxidantes decorrentes
17 da doença. Assim, este trabalho teve como objetivo: (i) avaliar o efeito direto de NPsAg sobre
18 o desenvolvimento *in vitro* de *B. oryzae*, e (ii) investigar o efeito da aplicação preventiva de
19 NPsAg sobre os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos em folhas de plantas
20 de arroz com sintomas de mancha parda.

21 2. MATERIAL E MÉTODOS

22 2.1. Ensaio *in vitro*

23 Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas/
24 Interação Patógeno Hospedeiro da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O efeito de
25 NPsAg no desenvolvimento de *B. oryzae* foi avaliado através do crescimento micelial e
26 germinação de esporos, utilizando as concentrações de 0; 1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ e o
27 fungicida Azoxystrobin (Priori®, Syngenta, Basel, witzerland, 2 mL L^{-1}). A concentração de 0
28 $\mu\text{L L}^{-1}$ caracterizou a testemunha (controle negativo) e o fungicida o controle positivo. Para
29 avaliação do crescimento micelial, os tratamentos foram incorporados em meio batata-dextrose-
30 ágar (BDA) previamente autoclavado, e em seguida vertidos em placas de Petri (10 mL/placa).
31 Posteriormente, um disco de BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio fúngico obtido da
32 borda de uma colônia de *B. oryzae* com 10 dias de idade, foi colocado no centro das placas de

Petri, que foram mantidas em uma câmara de crescimento (25 °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 12 placas de Petri, cada uma correspondendo a uma repetição. O índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVCM} = (C1 / N1) + (C2 / N2) + \dots + (Cn / Nn)$$

Em que: C1, C2 e Cn = diâmetro da colônia na primeira, segunda e n-ésima avaliação; N1, N2, Nn = número de dias após a instalação do ensaio.

Para avaliar a germinação de esporos de *B. oryzae*, as diferentes concentrações de NPsAg e o fungicida foram incorporados em meio àgar-água (AA) previamente autoclavado, e em seguida vertidos em placas de Petri (10 mL/placa). Posteriormente, uma alíquota de 100 µL de suspensão de conídios (10^5 conídios/mL), obtida de colônias cultivadas em BDA por dez dias, foi adicionada as placas e espalhada com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em 25°C durante 12 horas na ausência de luz, para que os conídios iniciassem o processo de germinação. A avaliação da germinação foi realizada por meio de contagem de 100 conídios utilizando microscópio óptico. Considerou-se germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo de comprimento igual ou maior a uma vez e meia o comprimento do conídio. Para cada tratamento foram considerados cinco repetições, sendo cada placa uma repetição, e a contagem feita em triplicata.

2.2. Ensaio *in vivo*

2.2.1. Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com sede em Recife-PE. A temperatura e umidade relativa do ar durante a condução do experimento foram registrados com auxílio *datalogger* (modelo RC-51H, Elitech®). A média geral de temperatura no decorrer do experimento foi de 25,30 °C (média diária mínima, 23,08 °C; média diária máxima, 27,84 °C). Já a média de geral da umidade relativa do ar foi de 85,58% (média diária mínima, 75,44%; média diária máxima, 92,44%). Sementes da cultivar tropical foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 3 min, e lavadas em água destilada por igual período. Em seguida, o semeio foi realizado em bandejas contendo areia autoclavada para a germinação. O transplântio das mudas foi realizado 10 dias após a emergência para vasos plásticos contendo 1 dm³ de solução

nutritiva preparada de acordo com Hoagland e Arnon (1950), com algumas modificações como segue: 1,0 mM KNO₃, 0,25 mM NH₄H₂PO₄, 0,1 mM NH₄Cl, 0,5 mM MgSO₄ .7H₂O, 1,0 mM (CaNO₃)₂, 0,3 µM CuSO₄ .5H₂O, 0,33 µM ZnSO₄.7H₂O, 11,5 µM H₃BO₃, 3,5 µM MnCl₂ .4H₂O, 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ .4H₂O, 25 µM de FeSO₄.7H₂O e 25 µM de etilenodiaminotetraacético (EDTA) dissódico. O pH da solução foi aferido e corrigido para 5,5-6,0 diariamente usando soluções de NaOH ou HCl (1 M). A solução nutritiva de cada vaso foi substituída a cada quatro dias.

2.2.2. Pulverização de NPsAg e inoculação com *B. oryzae*

Plantas de arroz com 35 dias de idade foram pulverizadas 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 *B. oryzae*. A preservação do patógeno e o preparo do inóculo foram realizados de acordo com Dallagnol et al. (2011). Uma suspensão de conídios de *B. oryzae* (1 × 10⁵ conídios mL⁻¹) foi aplicada como uma névoa fina nas folhas de cada planta até o escoamento, usando um atomizador VL Airbrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL, EUA). Gelatina incolor 5 g L⁻¹ foi adicionada em água estéril para auxiliar a adesão dos conídios às folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 90 ± 5% durante 24 horas no escuro. Após este período, as plantas foram transferidas para uma câmara clara coberta com plástico transparente com temperatura de 25 ± 30 °C, onde permaneceram até o final do experimento.

2.2.3. Avaliação da mancha parda

O número de lesões por centímetro quadrado de área foliar (NL), tamanho final da lesão (TL) e a severidade da mancha parda (Sev) foram avaliadas na quinta e sexta folha de cada planta as 48 e 72 horas após a inoculação (hai). O NL foi determinado em três locais escolhidos arbitrariamente em cada folha. O TL (mm) foi medido usando paquímetro digital eletrônico, sendo determinado em 10 lesões medidas em cada folha. A Sev foi quantificada usando uma escala baseada na porcentagem de área foliar doente proposta por Lenz et al. (2010). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada usando a integração trapezoidal da curva de progresso da MP ao longo do tempo usando a fórmula proposta por (Shaner 1977).

2.2.4. Determinação dos parâmetros fisiológicos

2.2.4.1. Fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*)

Parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a* (Fluorescência inicial [F_0]; Fluorescência variável [F_v]; Fluorescência máxima [F_m]; Eficiência quântica do fotossistema II [F_v/F_m]) foram estimados com auxílio de fluorômetro portátil (FluorPen, modelo FP100, Photon Systems Instrumentes) às 48 e 72 hai. As medições foram feitas na quarta folha (do ápice até a base) de cada planta. O protocolo de determinação da fluorescência foi adaptado de acordo com Souza et al. (2021).

2.2.4.2. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de Chl*a*, Chl*b* 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 48 e 72 hai. Os discos coletados foram imersos em tubos de vidro contendo 5 ml de solução saturada de 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 usado como um branco.

2.2.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Para todas as análises bioquímicas, as amostras de folhas de uma planta por repetição e tratamento foram coletadas as 0, 48 e 72 hai. As amostras de folhas foram mantidas em Nitrogênio líquido durante a amostragem e armazenadas a -20°C até análises posteriores. As enzimas foram extraídas do material congelado (200 mg de peso fresco), conforme descrito por Nunes-Nesi et al. (2007).

2.2.5.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinar as atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX), um total de 200 mg de tecido foliar homogeneizado foi moído em pó fino usando um almofariz e pilão ao adicionar nitrogênio líquido. O pó fino foi imediatamente homogeneizado em 2 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 de enzima bruto.

A atividade da SOD foi determinada usando o método descrito por Del Longo et al (1993), que mede a capacidade do SOD de reduzir fotoquimicamente o azul de p-nitrotetrazólio (NTB). A reação foi iniciada adicionando 40 µl do extrato enzimático bruto a 960 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 10 min. Após a exposição à luz, a luz 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 e Ries 1977). Para as amostras de controle, a mistura de reação foi mantida no escuro por 10 min e a absorbância medida a 560 nm. Os valores obtidos das amostras experimentais 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 e Horst 1991). Resumidamente, a reação foi iniciada após a adição de 25 µl do extrato enzimático bruto a 975 µl de uma mistura de reação consistindo em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) e 20 mM de H₂O₂. A determinação da atividade de CAT foi baseada na taxa de decomposição de H₂O₂ 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 µl do extrato enzimático bruto a 985 µl de uma mistura de reação contendo fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. A atividade da POX foi medida pela absorbância 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 Chance 1954). A atividade APX foi analisada usando o método proposto por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 25 µl do extrato enzimático bruto a 975 µl de uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H₂O₂ 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 (Nakano e Asada 2018). Essas atividades enzimáticas foram expressas com base em proteínas e sua concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

2.2.5.2.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 100 µL de extrato enzimático bruto a 0,9 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).

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios *in vitro* foram realizados em um delineamento inteiramente casualizado, e as médias das doses de cada tratamento comparadas pela análise de regressão. Os ensaios *in vivo* foram realizados em condições de casa de vegetação em um esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo o primeiro fator época de avaliação (0, 48 e 72 hai), o segundo fator, a inoculação (plantas não inoculadas e inoculadas com *B. oryzae*) e o terceiro, o tratamento com NPsAg (plantas não tratadas e tratadas com NPsAg), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso contendo quatro plantas. O experimento foi repetido uma vez. 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 um teste *t* ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS (v. 6.12; SAS Institute, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1.Ensaio *in vitro*

Para o ensaio *in vitro*, os ajustes de regressão linear para os parâmetros IVCm, diâmetro final da colônia e germinação de esporos de *B. oryzae* demonstraram redução a medida em que as doses de NPsAg aumentaram, sendo completamente interrompido nas concentrações

superiores a 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 1A). Houve redução de 57, 80 e 88% do IVCm para as doses de 1, 5 e 10 μL de NPsAg L^{-1} , respectivamente, comparado ao controle negativo. Similarmente para o diâmetro final da colônia, esta redução foi de 62, 80 e 86% (Fig. 1B). A germinação de esporos também foi significativamente reduzida em 80, 88 e 96% para as mesmas doses de NPsAg em comparação com o controle (Fig. 2). A concentração de 1 μL de NPsAg L^{-1} se mostrou similar ao controle positivo, azoxistrobina, usado como um composto de referência conhecido para comparar a ação antifúngica de NPsAg.

3.2. Ensaio *in vivo*

Os efeitos isolados dos fatores inoculação, estresse hídrico e tratamento com NPsAg, bem como as interações desses sobre os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos estão representados na Tabela I. Para os parâmetros epidemiológicos da mancha parda houveram reduções significativas de 79, 55, 93 e 89% no número de lesões, tamanho de lesões, severidade e AACPD, respectivamente, em folhas de plantas de arroz tratadas com NPsAg em comparação as plantas não tratadas (Fig. 3).

A comparação entre plantas -NPsAg e +NPsAg na ausência de infecção por *B. oryzae* não apresentou diferenças significativas nas concentrações dos pigmentos analisados. Os resultados revelam que a infecção reduziu significativamente o conteúdo de pigmentos nos dois tempos avaliados. O conteúdo de Chl *a* foi 39 -59% inferior às 48 e 72 hai. Similar ao que foi observado para os conteúdos de Chl *b* (46- 57%) e carotenoides (25- 44%) para esses mesmos períodos. Em contrapartida, as plantas INOC +NPsAg mostraram aumento nas concentrações de Chl *a* (27- 36%) e carotenoides (14- 40%) as 48 e 72 hai, Chl *b* (43%) as 72hai em relação as plantas INOC -NPsAg (Fig. 4).

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), parâmetro da fluorescência da clorofila *a* se apresenta na Fig. 5. A infecção por *B. oryzae* reduziu os valores de F_v/F_m em 49 e 39% às 48 e 72 hai, respectivamente. Em contraste, valores superiores em 48 e 37% foram observados para as plantas INOC +NPsAg às 48 e 72 hai, respectivamente, confirmando que a aplicação foliar de NPsAg restringiu a infecção.

De modo geral, as atividades das enzimas do sistema antioxidativo aumentaram suas atividades em plantas infectadas com *B. oryzae* quando comparada as plantas sadias, principalmente em plantas não tratadas com NPsAg (Fig. 6). Os resultados revelaram que nas plantas inoculadas e tratadas com NPsAg a atividade da SOD foi significativamente menor em 28 e 39%, respectivamente, às 48 e 72 hai, em relação as plantas sem tratamento com NPsAg.

1 Similarmente, estas reduções foram observadas nas atividades da POX em 67 e 34%, e APX
2 em 48 e 53% nesse mesmo período. A atividade de CAT foi reduzida em 61% as 72 hai em
3 plantas tratadas com NPsAg quando comparado ao controle.

4 A atividade da fenilalanina amônia liase está representada na Fig. 7. Diferença
5 significativa entre plantas NI e INOC foram observadas somente às 72 hai. Em plantas
6 inoculadas com *B. oryzae*, a atividade da FAL foi significativamente maior em plantas tratadas
7 com NPsAg, às 72 hai, quando comparado a plantas não tratadas.

8 DISCUSSÃO

9 O estudo *in vitro* evidenciou efeito direto de NPsAg sobre o desenvolvimento micelial
10 e germinação de conídios de *B. oryzae*. Pesquisas anteriores demonstraram o efeito direto de
11 NPsAg sobre uma ampla gama de fungos fitopatogênicos, incluindo *Aspergillus* spp.
12 (BOCATE et al., 2019), *Alternaria alternata* (Al-Otibi et al. 2021; Dashora et al. 2022; Mishra
13 et al., 2017b), *B. sorokiniana*, *Curvularia lunata* (Mishra et al. 2017b), *Fusarium oxysporum*
14 (Al-Otibi et al. 2021; Danish et al. 2022), *F. solani*, *Helminthosporium rostratum* (Al-Otibi et
15 al. 2021), *Sclerotium rolfsii* (Kanauiya et al. 2020; Mishra et al. 2017b) e *Rhizoctonia solani*
16 (Danish et al. 2022; Kanauiya et al. 2020; Kora et al. 2020). Todos de acordo com nossos
17 achados.

18 Dentre os mecanismos de ação com atividade antimicrobiana destacam-se danos ao
19 DNA e a ruptura da parede celular fúngica (Dakal et al. 2016; Modena et al. 2019). Em síntese,
20 as nanopartículas se aderem a parede celular e membrana celular gerando deformações e
21 comprometendo o processo respiratório e a produção de metabólicos essenciais a célula
22 fúngica. A permeabilidade da membrana celular fúngica também pode ser alterada por danos
23 causados nas bombas de prótons e desnaturação de proteínas de superfície, que levam ao
24 rompimento da membrana celular, resultando no vazamento de macromoléculas ou alterações
25 no transporte das membranas, que então danifica o DNA das células, causando a morte celular
26 (Nayantara e Kaur 2018; Nisar et al. 2019; Rajan et al. 2015). Além disso, pode ocorrer a
27 peroxidação lipídica decorrente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio
28 (Kanauiya et al. 2020; Kumari et al. 2019).

29 A presença de conídios multicelulares, que geralmente germinam bipolarmente na
30 maturidade, podendo gerar mais de um ponto de infecção, é uma característica marcante de *B.*
31 *oryzae*. O processo de infecção começa com a germinação dos conídios na superfície da folha,
32 seguida da formação de apressórios que originam hifas de infecção, as quais penetram nas

células (Ou 1985). A inibição mediada por NPsAg sobre germinação dos conídios associado a menor desenvolvimento micelial de *B. oryzae* sugere uma menor capacidade de infecção e colonização nos tecidos do arroz, indicando redução de sintomas da mancha parda.

Objetivando investigar essa hipótese, selecionamos a concentração de NPsAg que apresentou elevado potencial inibitório no ensaio *in vitro* ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) para analisar *in vivo* o efeito em plantas de arroz infectadas por *B. oryzae*. Reduções significativas no NL, TL, severidade e AACPD foram observadas nas plantas tratadas com NPsAg em relação as plantas não tratadas. Percentuais significativos para outras doenças de importância econômica do arroz também já foram relatados, a exemplo da brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, mostrando uma redução de 35% na severidade da doença com o tratamento com NPsAg a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Elamawi e El-Shafey 2013). Da mesma forma, Ahmed et al. (2021) observaram redução no tamanho das lesões causadas por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz variando em torno de 30 a 72% de acordo com a concentração da suspensão de NPsAg que as plantas receberam (25 a 100 mg L^{-1}).

O potencial antimicrobiano das NPsAg de amplo espectro contribuiu com o aumento no número de pesquisas envolvendo o controle de doenças de plantas. Com isso, aumentou também a preocupação com o seu efeito sobre microrganismos benéficos presentes na rizosfera. Testes conduzidos com NPsAg contra rizobactérias que atuam no crescimento vegetal e controle biológico da mancha parda do arroz, mostrou uma reação diferente. Resultados obtidos por Mirzajani et al. (2013) mostram que em concentrações de até $30 \mu\text{L mL}^{-1}$, NPsAg induziram o aumento populacional de *Bacillus amyloliquefaciens*. Em contrapartida, redução significativa foi observada com aumento dessa concentração até $60 \mu\text{L mL}^{-1}$. Mais recentemente, Yan et al. (2022) demonstraram que NPsAg a 1 mg kg^{-1} causou aumento significativo na população de rizobactérias benéficas, incluindo *Frankiales*, *Rhizobiales*, *Chitinophagales* e *Saccharimonadia* em arroz. Relatos na literatura sugerem que o seu efeito positivo ou negativo se relaciona com a concentração utilizada, se tornando negativo com aumento progressivo na concentração. Destacamos aqui, que a concentração usada em nosso estudo ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) é significativamente inferior aos estudos anteriores, sugerindo baixo risco a comunidade microbiana benéfica.

Analisando os parâmetros fisiológicos, observamos que a infecção por *B. oryzae* reduziu significativamente a concentração de pigmentos e eficiência quântica do fotossistema II. Corroborando com relatos na literatura sobre as alterações fisiológicas no presente patossistema, descritas por Marwein et al. (2022), mostrando que genes relacionados a

1 fotossíntese são regulados negativamente nos estágios iniciais da infecção. Isso ocorre,
2 principalmente, devido a produção de toxinas (ofiobiolina A e ofiobiolina B) do patógeno, que
3 causam peroxidação lipídica com consequente redução das defesas antioxidantes nos
4 cloroplastos, o que leva a diminuição do teor de clorofila e da atividade fotossintética. No
5 presente estudo, observamos que plantas inoculadas que receberam a aplicação de NPsAg
6 apresentaram aumento na concentração de Chl *a* e Chl *b*, além de maior eficiência quântica do
7 fotossistema II, em relação as plantas que não foram tratadas.

8 A eficiência quântica do fotossistema II, medida pela razão F_v/F_m , determina se o
9 tratamento imposto afeta ou não a eficiência do fotossistema II (Takeda et al. 1995). A maior
10 eficiência quântica (F_v/F_m) registrada nas plantas tratadas com NPsAg indica que um maior
11 número de centros de reação está em “estado aberto” para realizar reação a luz. Assim, nossas
12 observações mostram que o tratamento com NPsAg implicam menor incidência de dano foto-
13 oxidativo nas plantas sob infecção por *B. oryzae*. Essas observações indicam claramente que
14 NPsAg melhoram a eficiência da troca de elétrons nas plantas tratadas. Um mecanismo eficiente
15 de troca de elétrons reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante
16 o processo de infecção.

17 Sob condições de homeostase, o acúmulo de EROS é neutralizado por mecanismos
18 antioxidantes, que consiste em componentes não enzimáticos e enzimáticos. Superóxido
19 dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX) estão
20 entre os sistemas antioxidantes enzimáticos envolvidas no processo de redução de O_2^- a H_2O_2 ,
21 e por fim em H_2O e O_2 (Nadarajah 2020). Os maiores níveis de enzimas antioxidantes em nosso
22 estudo foram registrados em plantas infectadas. Essas diferenças marcantes na atividade das
23 enzimas do sistema antioxidativo entre os tratamentos demonstram que após exposição a *B.*
24 *oryzae*, ocorreu o dano celular oxidativo e, consequentemente, aumentou a atividade de SOD,
25 CAT, POX e APX.

26 Por outro lado, os resultados deste estudo revelaram aumento significativo na atividade
27 da FAL em plantas infectadas e tratadas com NPsAg. A FAL é uma importante enzima da via
28 fenilpropanóide que catalisa a desanimação não oxidativa da L-fenilalanina em ácido trans-
29 cinâmico. Essa via é rica em uma ampla gama de compostos fenólicos, como flavonoides,
30 hormônios vegetais, antocianinas, lignina e fitoalexinas que desempenham um papel importante
31 na defesa vegetal (Dixon e Paiva 1995). Aqui, a alta atividade da FAL em plantas sob infecção
32 que receberam NPsAg sugere que respostas de defesa foram desencadeadas, com possível
33 aumento na deposição de lignina, atuando como barreira estrutural a infecção fúngica, como

1 verificado pelo menor número de lesões, severidade da doença e AACPD. O aumento na
2 deposição de lignina na parede celular mediante aplicação de NPsAg foi bem descrito em
3 trabalhos anteriores e correlacionado positivamente com maior resistência a infecção
4 (MISHRA et al., 2014, 2017a).

5 Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram que NPsAg inibiram
6 eficientemente *B. oryzae in vitro*, e reduziram a severidade da mancha parda em arroz *in vivo*.
7 Consequentemente, permitiram a preservação do processo fotossintético, aliado a menor
8 estresse oxidativo e maior atividade da FAL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F. et al. 2021. Applications of copper and silver nanoparticles on wheat plants to induce drought tolerance and increase yield. *IET Nanobiotechnology* 15: 68–78.
- Al-Otibi, F. et al. 2021. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Malva parviflora* and their antifungal activity. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(4): 2229–2235.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K., and Stewart, C. R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109(4):1247–1257.
- Bahrami-Teimoori, B. et al. 2017. Characterisation and antifungal activity of silver nanoparticles biologically synthesised by *Amaranthus retroflexus* leaf extract. *Journal of Experimental Nanoscience* 12(1): 129–139.
- Bates, L. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 207: 205–207.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1): 276–287.
- Bocate, K. P. et al. 2018. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *International Journal of Food Microbiology* 291: 79–86.
- Bradford, M. N. 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., and Horst, W. J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83(3): 463–468.
- Chen, H. 2018. Metal based nanoparticles in agricultural system: Behavior, transport, and interaction with plants. *Chemical Speciation and Bioavailability* 30(1): 123–134.
- Cruz-Luna, A. R. et al. 2021. Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: Current advances and future directions. *Journal of Fungi* 7(12): 1033.
- Dakal, T. C. Kumar, A., Majumdar, R. S., and Yadav, V. 2016. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology* 7: 1831.
- Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. A., Martins, S. C., Cavatte, P. C., and DaMatta, F. M. 2011. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology* 40(4): 360–365.
- Danish, M. et al. 2022. Nano-pesticidal potential of *Cassia fistula* (L.) leaf synthesized silver nanoparticles (Ag@CfL-NPs): Deciphering the phytopathogenic inhibition and growth augmentation in *Solanum lycopersicum* (L.). *Frontiers in Microbiology* 13: 1–18.
- Dashora, A., Rathore, K., Raj, S., and 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.
- Debona, D., Nascimento, K. J. T., Gomes, J. G. O., Aucique-Perez, C. E., and Rodrigues, F. A. 2016. Physiological changes promoted by a strobilurin fungicide in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130: 8–16.
- Del Longo, O. T., González, C. A., Pastori, G. M., and Trippi, V. S. 1993. Antioxidant defenses 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(7): 1085.

- Doke, N. et al. 1996 The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant biodefence - a review. *Gene* 179: 45-51.
- Elamawi, R. M. A., and EL-SHAFFEY, R. A. S. 2013. Inhibition effects of silver nanoparticles against rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea*. *Egyptian Journal of Agricultural Research* 91(4): 1271-1283.
- Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59(2): 309-14.
- Guo, Y., Liu, L., and Bi, Y. 2007. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in China cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *Int J Food Sci Tech* 42: 1012-1018.
- Kanaujiya, D., Kumar, V., Dwivedi, S. K., and Prasad, G. 2020. Photobiosynthesis of Silver Nanoparticle Using Extract of *Aspergillus flavus* CR500: Its Characterization, Antifungal Activity and Mechanism Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Cluster Science* 31(5): 1041-1050.
- Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57(2): 315-319.
- Kaufmann, M., and Michel, B. 1973. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant physiology* 51: 914-916.
- Khush, G. S. 2005. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59(1): 1-6.
- Kora, A. J., Mounika, J., and Jagadeeshwar, R. 2020. Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An *in vitro* fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. *Fungal Biology* 124(7): 671-681.
- Kumari, M. et al. 2019. An insight into the mechanism of antifungal activity of biogenic nanoparticles than their chemical counterparts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 157: 45-52.
- Lenz, G., Balardin, R. S., Dalla Corte, G., Marques, L. N., and Debona, D. 2010. Diagrammatic scale for assessment of rice brown spot severity. *Ciencia Rural* 40(4): 752-758.
- Maehly, A. C., and Chance, B. 1954. The Assay of Catalase and Peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis* 1: 358-423.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Malandrakis, A. A., Kavroulakis, N., and Chrysikopoulos, C. V. 2020. Synergy between Cu-NPs and fungicides against *Botrytis cinerea*. *Science of the Total Environment* 703: 135557.
- Marwein, R. et al. 2022. Transcriptome-wide analysis of North-East Indian rice cultivars in response to *Bipolaris oryzae* infection revealed the importance of early response to the pathogen in suppressing the disease progression. *Gene* 809: 146049.
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M., and Ghassempour, A. 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety* 88: 48-54.
- Mishra, S. et al. 2014. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS ONE* 9(5): e97881.
- Mishra, S., Singh, B. R., Naqvi, A. H., and Singh, H. B. 2017. Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens. *Scientific Reports* 7(1): 1-15.
- Mishra, S., Yang, X., Ray, S., Fraceto, L. F., and Singh, H. B. 2020. 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* 36: 1-10.

- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., and Wuttke, S. 2019. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials* 31(32): 1901556.
- Nadarajah, K. K. 2020. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21(15): 5208.
- NAKANO, Y., ASADA, K. APX Nakano & Asada 1981.pdf. *Plant & Cell Physiology*, v. 22, n. May, p. 867–880, 2018.
- Namburi, K. R., Kora, A. J., Chetukuri, A., and Kota, V. S. M. K. 2021. Biogenic silver nanoparticles as an antibacterial agent against bacterial leaf blight causing rice phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44(9): 1975-1988.
- Nayantara, Kaur, P. 2018. Biosynthesis of nanoparticles using eco-friendly factories and their role in plant pathogenicity: a review. *Biotechnology Research and Innovation* 2(1): 63–73.
- Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., and Shinwari, Z. K. 2019. Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 24(7): 929–941.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S. I., and Kalaichelvan, P. T. 2015. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products* 70: 356–373.
- Santos, R. P., Cruz, A. C. F. D., Iarema, L., Kuki, K. N., and Otoni, W. C. 2008. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres* 55(4): 356–364.
- Savary, S. et al. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3(3): 430–439.
- Scholander, P. F., Bradstreet, E. D., Hemmingsen, E. A., and Hammel, H. T. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148(3668): 339–346.
- Shaner, G. 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 77(8): 1051.
- Souza, A. A. B, Nascimento, C. W. A, Souza, E. R. 2021. Mineral composition, chlorophyll fluorescence and zinc biofortification in *Vigna unguiculata* fertilized with bulk and nanoparticulate zinc oxides. *Acta Physiologiae Plantarum* 43(12): 159.
- Takeda, T., Yokota, A., and Shigeoka, S. 1995. Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant and cell physiology* 36(6): 1089-1095.
- Wellburn, A. R. 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(3): 307–313.
- Yan, X. et al. 2022. Rice exposure to silver nanoparticles in a life cycle study: effect of dose responses on grain metabolomic profile, yield, and soil bacteria. *Environmental Science: Nano* 9(6): 2195-2206.
- Zucker, M. 1965. Induction of phenylalanine ammonia deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissues. *Plant Physiology* 40(5): 779.

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos época de avaliação (EA), inoculação (I) e tratamento com NPsAg (NPsAg) sobre a severidade (Sev), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), tamanho de lesões (TL), número de lesões (NL), fenilalanina amônia-liase (FAL), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b*, (Chl *b*) e carotenoides.

^a Variáveis	^b F valores						
	EA	I	NPsAg	EA × I	EA × NPsAg	I × NPsAg	EA × I × NPsAg
Sev	36,54**	-	173,40***	-	6,12 ^{ns}	-	-
AACPD	-	-	409,72***	-	-	-	-
TL	-	-	79,26***	-	-	-	-
NL	-	-	284,81***	-	-	-	-
FAL	5,21*	3,05 ^{ns}	9,81**	1,97 ^{ns}	4,09*	0,79 ^{ns}	0 ^{ns}
SOD	1,97 ^{ns}	6,63*	33,40***	0,43 ^{ns}	1,88 ^{ns}	15,71***	4,45*
CAT	7,57**	11,33**	18,33***	2,47 ^{ns}	4,14*	2,99 ^{ns}	8,09***
POX	19,73***	129,86***	27,57***	9,25**	4,57*	25,07***	1,68 ^{ns}
APX	44,15***	58,64***	10,26**	6,39*	9,42***	3,36 ^{ns}	7,63**
F_v/F_m	0,01 ^{ns}	47,44***	38,77***	0,26 ^{ns}	0,22 ^{ns}	39,74***	0,02 ^{ns}
Chl <i>a</i>	2,63 ^{ns}	974,05***	62,03***	25,36***	15,70***	43,50***	0,07 ^{ns}
Chl <i>b</i>	4,04 ^{ns}	127,87***	1356,30***	25,29***	0 ^{ns}	9,63**	20,81***
Carotenoides	1,82 ^{ns}	149,36***	4,27*	26,86***	6,78 ^{ns}	0,33 ^{ns}	4,96 ^{ns}

^a Efeito principal e efeito da interação dos fatores Época de avaliação (EA; 48 e 72 horas após a inoculação), Inoculação de Plantas (I; não inoculada e inoculada com *B. oryzae*) e Nanopartículas de prata (NPsAg; não pulverizada ou pulverizada com Nanopartículas de prata),

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

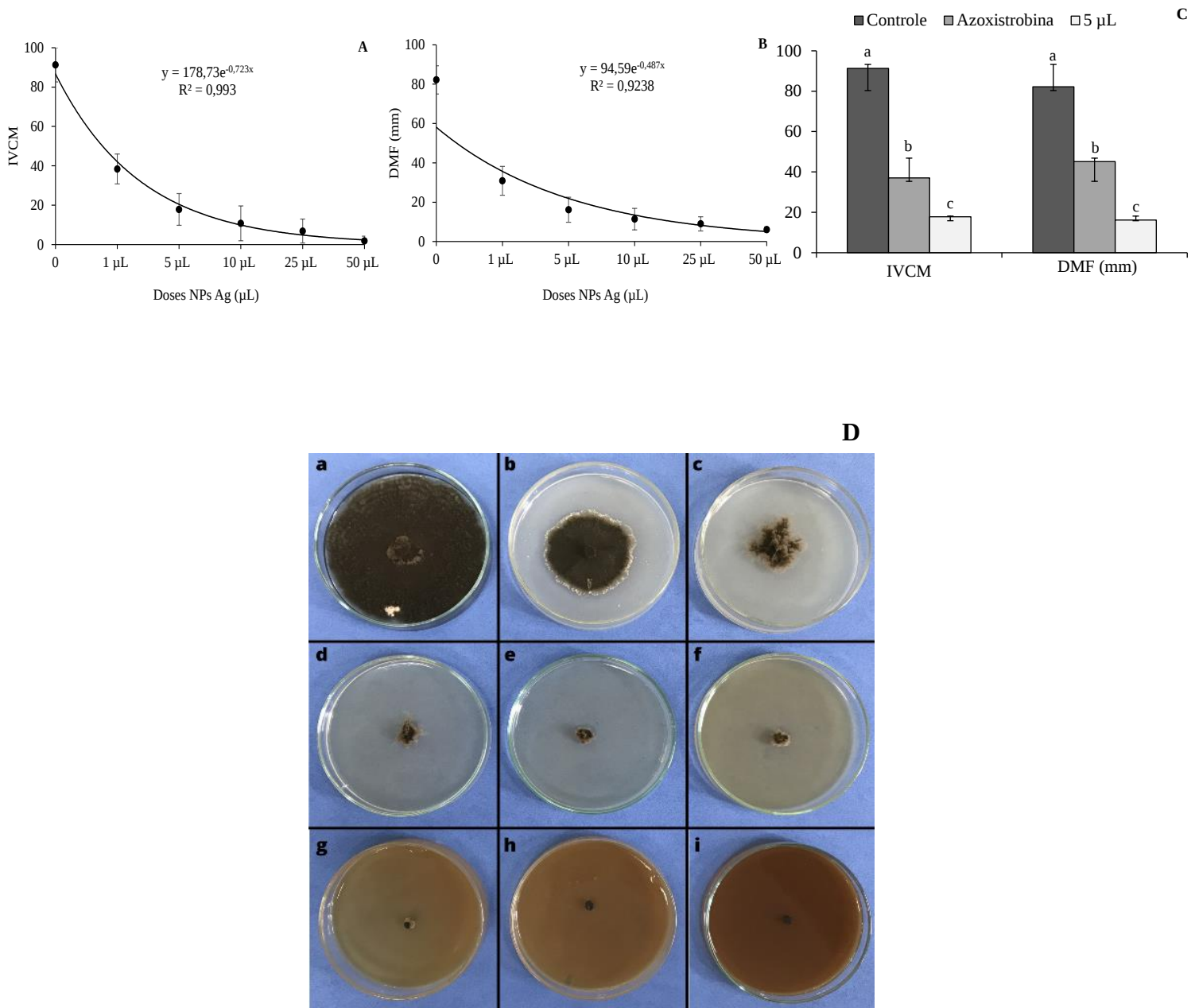


Figura 1. Análise de regressão do efeito de Nanopartículas de prata (NPsAg) sobre o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (A) e diâmetro médio final (DMF) (B) de *Bipolaris oryzae*. Comparação das médias dos tratamentos controle, azoxistrobina e 5 μL de NPsAg L^{-1} no IVCM e DMF (C). DMF dos tratamentos (D) controle (a), azoxistrobina (b) e as doses de 1(c), 5(d), 10(e), 25(f), 50(g), 100 (h) e 200 μL de NPsAg L^{-1} (i). Para cada variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os desvios padrão das médias. R^2 = coeficiente de determinação. $n = 10$.

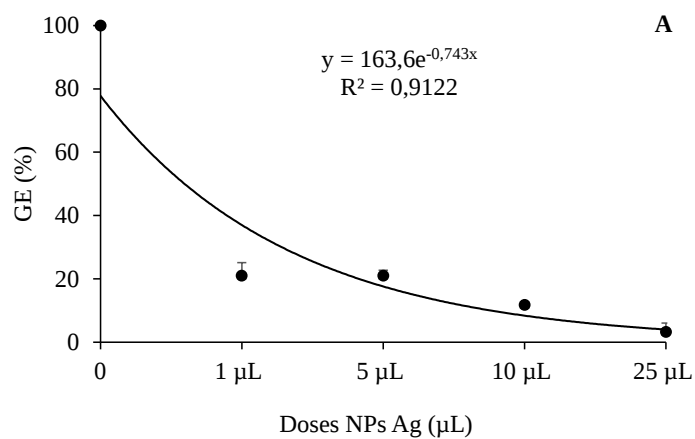


Figura 2. Análise de regressão do efeito de Nanopartículas de prata (NPsAg) sobre a germinação de *Bipolaris oryzae* (A). Comparação entre controle (B) e o tratamento com NPsAg (5μL L⁻¹) (C). As barras indicam os desvios padrão das médias. R^2 = coeficiente de determinação. n = 10.

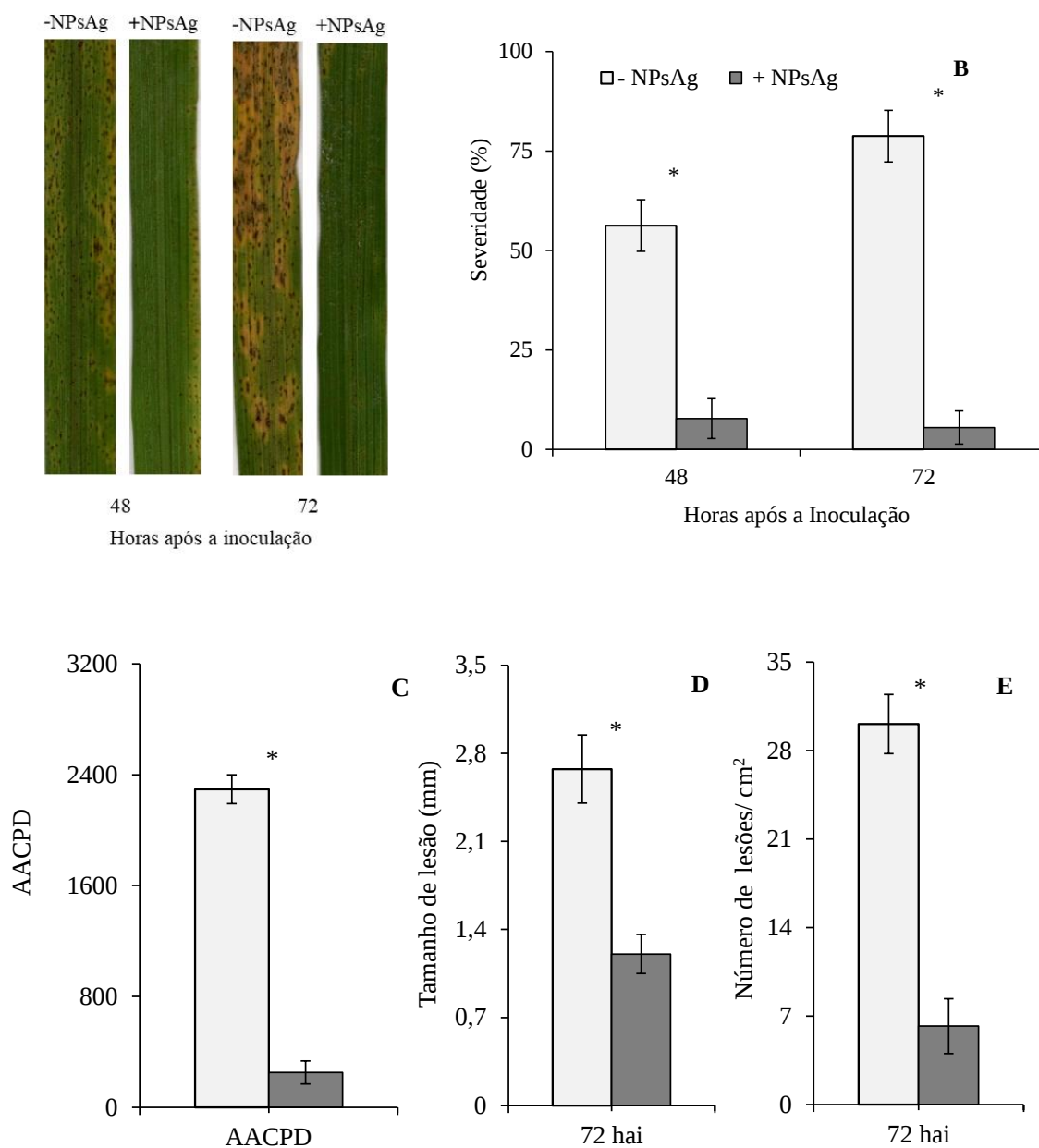


Figura 3. Número de lesões (NL) por cm² (A), tamanho de lesão (B), severidade (C) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (D) sem NPsAg ou com NPsAg (5 µL L⁻¹). As médias dos tratamentos que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de *t*. As barras representam os desvios padrão das médias. n = 10

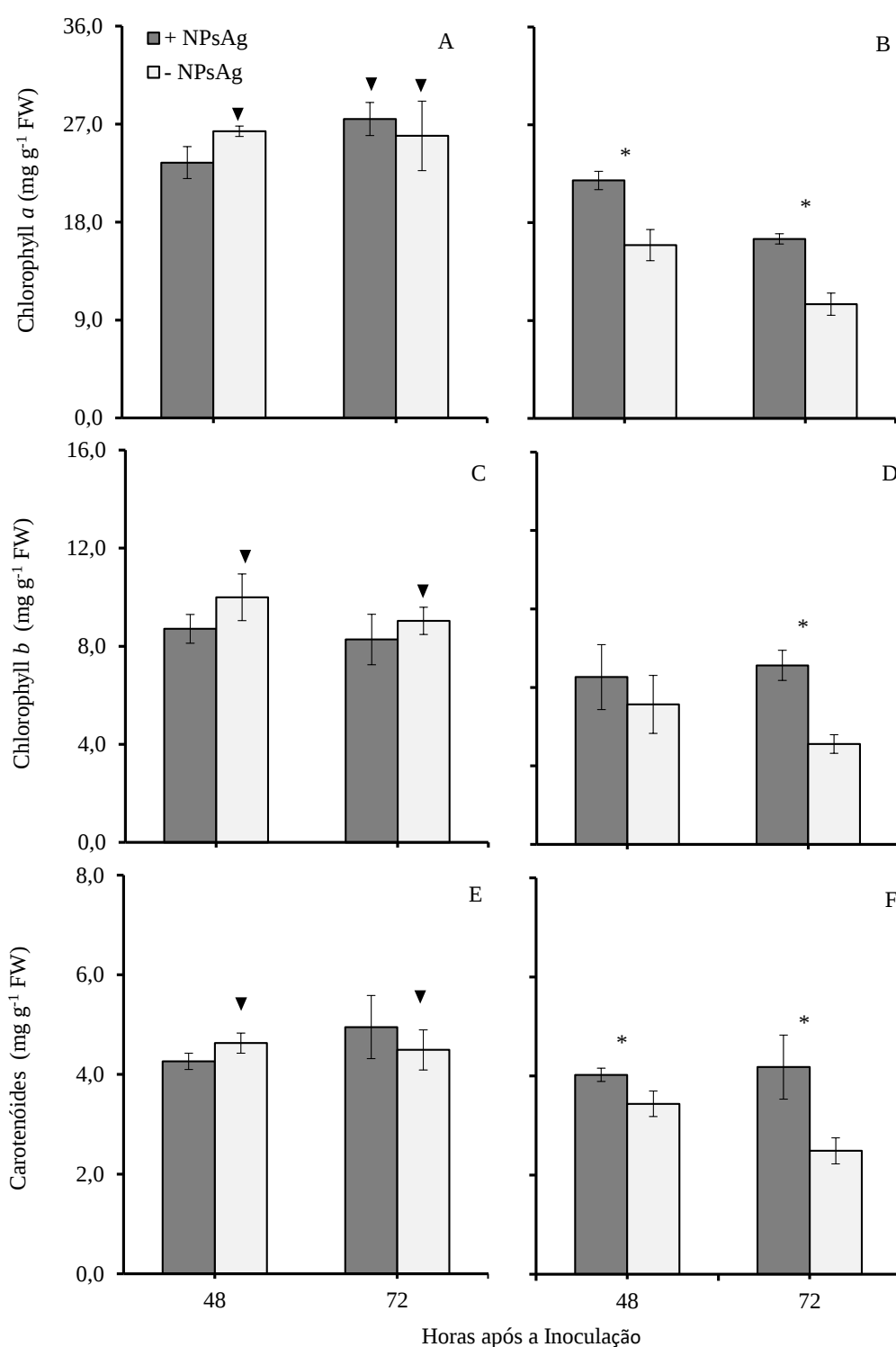


Figura 4. Concentração de clorofila (Chl) *a* (A e B), Chl *b* (C e D) e carotenóides (E e F) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz tratadas (+NPsAg) ou não (-NPsAg) com Nanopartículas de Prata. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

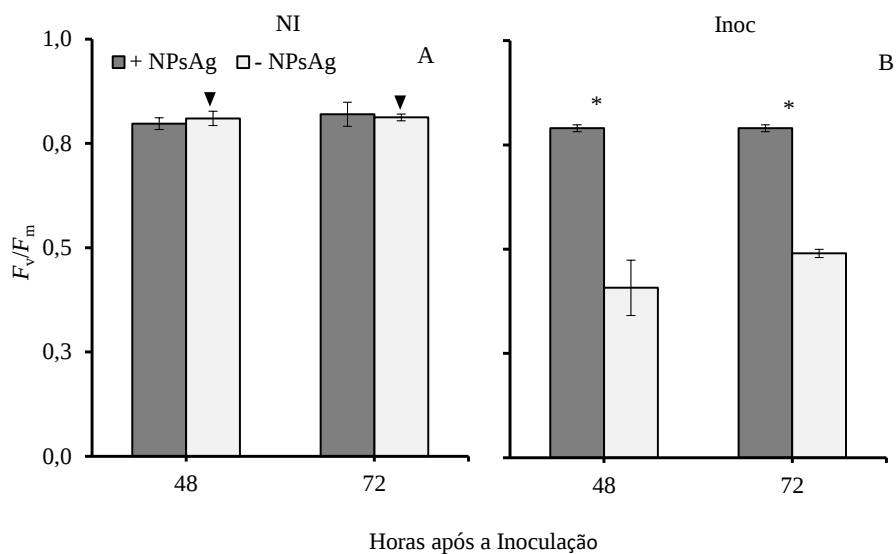


Figura 5. Eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) determinada a partir de folhas de plantas de arroz tratadas (+NPsAg) ou não (-NPsAg) com Nanopartículas de Prata. Plantas não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de 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 de t . As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

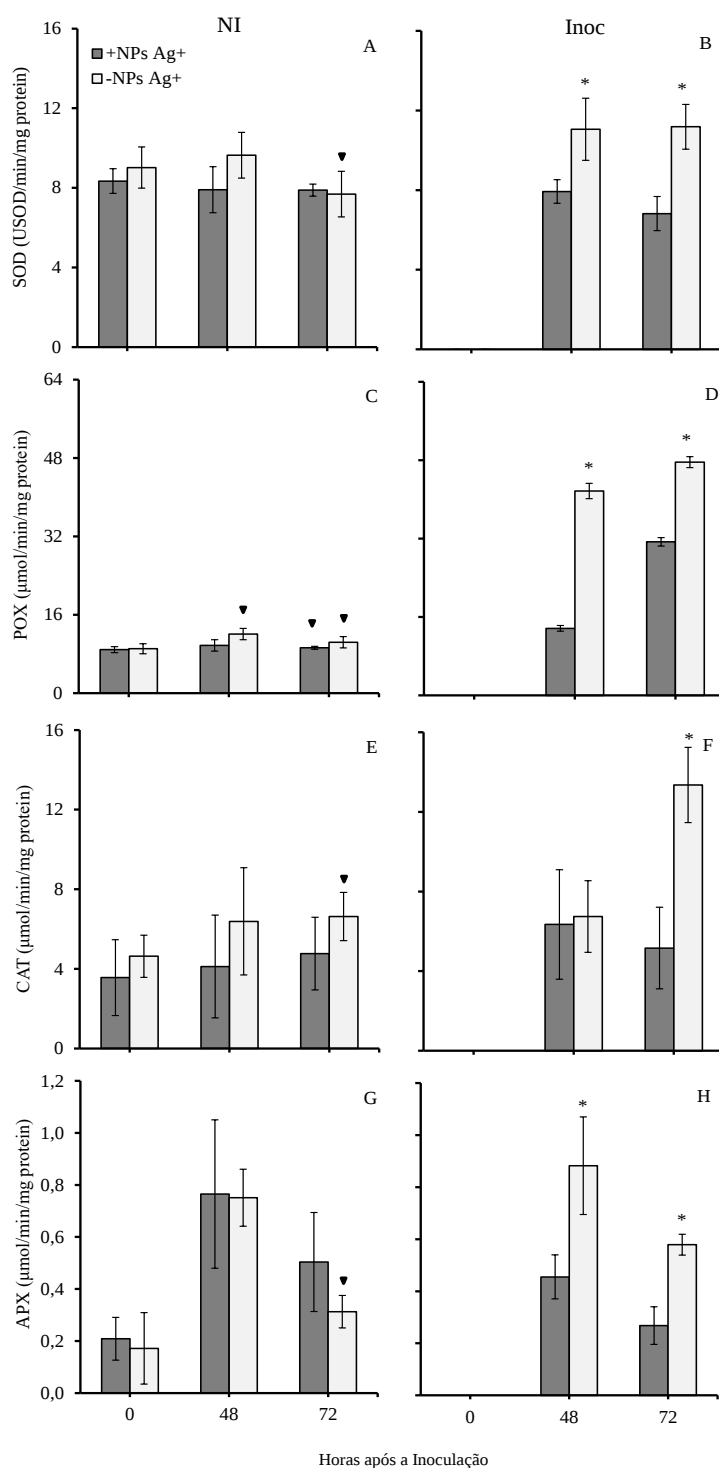


Figura 6. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D, catalase (CAT) (E e F) e ascorbato peroxidase (APX) (G e H) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz tratadas (+NPsAg) ou não (-NPsAg com Nanopartículas de Prata. Plantas não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

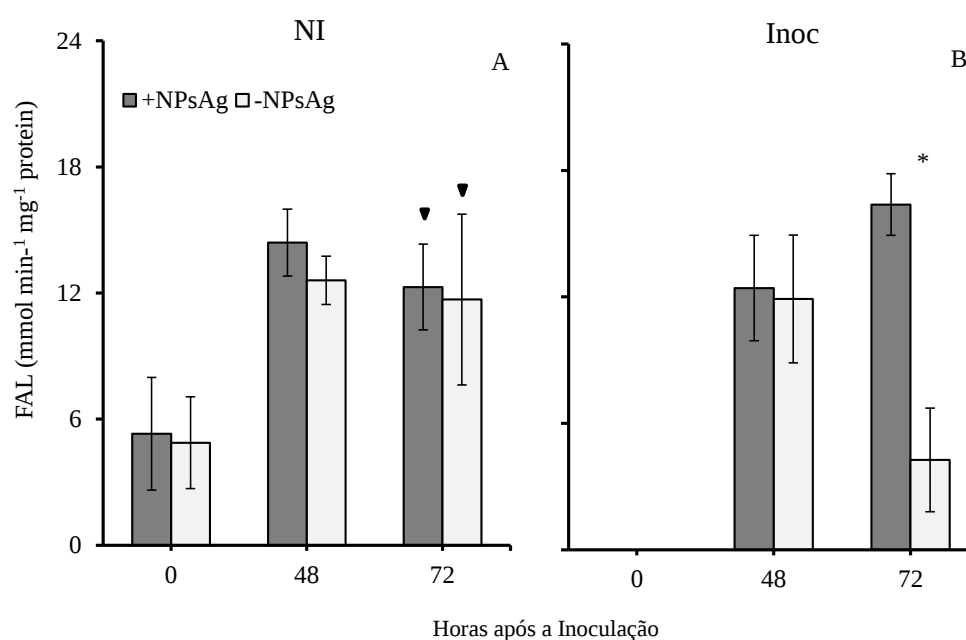


Figura 7. Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) em folhas de arroz (A, B) tratadas (+NPsAg) ou não (-NPsAg) com Nanopartículas de Prata. Plantas não foram inoculados (NI) ou inoculados (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas por 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

CAPÍTULO III

**Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos em Folhas de Plantas de Arroz sob
Condições de Estresse hídrico Leve e Infectadas por *Bipolaris oryzae***

Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos em Folhas de Plantas de Arroz sob Condições de Estresse hídrico Leve e Infectadas por *Bipolaris oryzae*

Larissa Cavalcante Almeida¹, Bruno Leonardo Mendes¹, David Ferreira Duarte¹, Thais Ribeiro Santiago², Monaliza Alves dos Santos³, Edivan Rodrigues de Souza³, Jonas Alberto Rios^{1,4*}

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

Em condições de campo, as plantas são frequentemente expostas a múltiplos estresses bióticos e abióticos, a exemplo do estresse hídrico e infecção por *Bipolaris oryzae* em campos de cultivos de arroz. Este trabalho objetivou compreender as alterações decorrentes do estresse hídrico na infecção por *B. oryzae*, agente causal da mancha parda (MP) em plantas de arroz, bem como o potencial NPsAg no controle desta doença em plantas sob ambos estresses combinados. Para isso, experimento *in vivo* foi instalado em condições de casa de vegetação avaliando parâmetros epidemiológicos (número e tamanho de lesões, severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)), fisiológicos (fluorescência da clorofila (Chl) *a*, concentração de pigmentos fotossintéticos e potencial hídrico foliar), e bioquímicos, como atividade de antioxidantes enzimáticos (peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD)) e não enzimáticos (prolina) e atividade da enzima de defesa, fenilalanina amônia liase (FAL). Nosso estudo demonstrou que plantas submetidas a estresse hídrico apresentaram reduções nos sintomas da mancha parda do arroz. Por apresentar menor severidade, a funcionalidade do aparato fotossintético foi menos afetada nestas plantas, conforme observado nas maiores concentrações de clorofila (Chl) *a*, Chl *b* e carotenoides, além de maior eficiência quântica do fotossistema II nas plantas sob a combinação de estresses. Todavia, o efeito do estresse hídrico reduziu significativamente o potencial hídrico das plantas não inoculadas e inoculadas pelo patógeno. As atividades de SOD e POX, além do teor de prolina aumentaram nas plantas sob infecção por *B. oryzae*, com aumento superior nas plantas que foram submetidas previamente ao estresse hídrico. A atividade da FAL foi significativamente maior em plantas submetidas ao estresse hídrico e inoculadas com *B. oryzae*. A pulverização foliar com NPsAg nas plantas submetidas as tensões combinadas reduziu significativamente o NL, TL, severidade e AACPD da doença. Tomados em conjunto, pode-se concluir que o estresse hídrico combinado com MP levou ao aumento nos teores de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, além de maior atividade da FAL. O tratamento foliar com NPsAg reduziu os parâmetros epidemiológicos da MP do arroz em combinação com estresse hídrico, indicando potencial uso como mitigador de estresse.

Palavras-chave: Estresse hídrico, Fotossíntese, Mancha Parda, Nanopartículas de Prata

ABSTRACT

Under field conditions, plants are often exposed to multiple biotic and abiotic stresses, such as drought stress and *Bipolaris oryzae* infection in rice crops. This study aimed to understand the changes resulting from drought stress on *B. oryzae* infection, the causal agent of brown spot (BS) in rice plants, as well as the potential of AgNPs in controlling this disease in plants under both combined stresses. For this purpose, an *in vivo* experiment was conducted under greenhouse conditions, evaluating epidemiological parameters (number and size of lesions, severity, and area under the disease progress curve (AUDPC)), physiological parameters (chlorophyll (Chl) *a* fluorescence, concentration of photosynthetic pigments, and leaf water potential), and biochemical parameters such as enzymatic antioxidant activity (peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD)) and non-enzymatic activity (proline), as well as the activity of the defense enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL). Our study demonstrated that plants subjected to drought stress showed reductions in symptoms of rice brown spot. Due to lower severity, the functionality of the photosynthetic apparatus was less affected in these plants, as observed by higher concentrations of Chl *a*, Chl *b*, and carotenoids, as well as higher quantum efficiency of photosystem II in plants under the combination of stresses. However, the effect of drought stress significantly reduced the water potential of both non-inoculated and inoculated plants by the pathogen. SOD and POX activities, as well as proline content, increased in plants under *B. oryzae* infection, with a greater increase in plants previously subjected to drought stress. PAL activity was significantly higher in plants subjected to drought stress and inoculated with *B. oryzae*. Foliar spray with AgNPs on plants subjected to combined stresses significantly reduced the number of lesions, lesion size, severity, and AUDPC of the disease. Taken together, it can be concluded that drought stress combined with BS led to an increase in enzymatic and non-enzymatic antioxidant levels, as well as higher PAL activity. Foliar treatment with AgNPs reduced the epidemiological parameters of rice brown spot under drought stress, indicating its potential use as a stress mitigator.

Keywords: Drought stress, Photosynthesis, Brown spot, Silver nanoparticles

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, com produção anual global superior a 640 milhões de toneladas, sendo considerado importante fonte de carboidratos e outros nutrientes (FAO, 2021). A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker, pode afetar negativamente a qualidade e a produtividade de grãos em até 74% em regiões produtoras de arroz em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais (Kohls et al., 1987; Ou 1972). Os sintomas característicos da mancha parda são lesões castanho-avermelhado circundado por um halo amarelo e com um centro cinza (Ou, 1985; Dallagnol et al., 2011a). As estratégias de manejo para mancha parda são limitadas, sendo recomendado o controle genético e, principalmente, a aplicação de fungicidas (Debona et al. 2016).

As plantas são simultaneamente desafiadas por múltiplos estresses abióticos e bióticos, sendo necessário o desenvolvimento de inúmeras repostas adaptativas. No cenário atual, é provável que os efeitos do aquecimento global aumentem a probabilidade de ocorrência simultânea destes estresses (Jeyasri et al., 2021; Radha et al., 2023; Stephen et al., 2022). Em ambientes de cultivo de arroz, por exemplo, algumas pressões abióticas estimulam a infecção de agentes causais bióticos, agravando as perdas de produtividade e qualidade dos grãos. A exemplo da mancha parda do arroz causada por *Bipolaris oryzae*, que pode se tornar mais frequente e severa, sobretudo em condições de aumento de temperatura e restrição hídrica, com consequente expansão da área endêmica da doença em todo o mundo (Barnwal et al., 2013; Mizobuchi et al., 2016; Savary et al., 2005).

Embora a interação entre fatores bióticos e abióticos nas plantas tenha sido analisada nos últimos anos por meio da extrapolação de informações de respostas individuais ao estresse, as respostas fisiológicas e moleculares que ocorrem em plantas expostas a uma combinação simultânea desses estresses permanecem indefinidas. Isso porque a ocorrência simultânea de um estresse abiótico com um estresse biótico pode agravar ou inibir a ocorrência deste último, levando a suscetibilidade aumentada ou tolerância das plantas a patógenos (Pandey et al., 2015; Pandey et al., 2017; Ramegowda & Senthil-Kumar, 2015). A resposta da planta ao estresse combinado depende de vários fatores, incluindo idade, espécies ou ecótipos e condições de crescimento das plantas. Além disso, a ordem de ocorrência de cada estresse, sua intensidade e duração da exposição também influenciam as respostas das plantas (Zhang & Sonnewald, 2017).

A seca severa ou leve provoca diferentes mecanismos de resposta em plantas, que podem alterar seus mecanismos de defesa contra a infecção por patógenos. Por exemplo, relatos

anteriores demonstraram que a infecção de *Biscogniauxia mediterranea* e *Obolarina persica*, agente etiológico da mancha do carvão vegetal, em espécies de carvalho, sob baixos níveis de umidade do solo resultou em maior descoloração das folhas e casca, lesões no caule e murcha em comparação com as plantas infectadas cultivadas sob umidade ideal do solo (Ghanbary et al., 2021). Por outro lado, as plantas estressadas pela seca demonstraram resistir a certos patógenos que requerem condições ambientais úmidas. No tomateiro, o estresse hídrico reduziu a infecção de *Botrytis cinerea* em 50% e também suprimiu a disseminação de *Oidium neolycopersici*, devido ao aumento concomitante dos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA), fitohormônio regulador da abertura e fechamento dos estômatos (Achuo et al., 2006).

As implicações decorrentes do estresse hídrico (Basu et al., 2017; Jin et al., 2013; Kumar et al., 2023) e da infecção por *B. oryzae* (Dallagnol et al., 2011; Marwein, et al., 2022) em plantas de arroz já foram anteriormente documentadas separadamente. Persiste a questão de como plantas de arroz respondem a combinação desses estresses e de que forma os impactos decorrentes podem ser mitigados. Atualmente, a nanotecnologia assume um papel fundamental para enfrentar esse desafio e encontrar soluções. Em nosso estudo anterior, a aplicação de NPsAg em plantas de arroz reduziu significativamente a infecção por *B. oryzae*. Em geral, os parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram preservados. Outros estudos indicam ainda efeito fitoestimulador de NPsAg no desenvolvimento de plantas de arroz em diferentes estágios fenológicos (Gupta et al., 2018; Yan et al., 2022). O estudo atual foi conduzido para entender de que forma o estresse hídrico pode influenciar o desenvolvimento da mancha parda do arroz.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição combinada de estresse hídrico e infecção por *B. oryzae* avaliando os parâmetros, epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos, além de avaliar o potencial de NPsAg no controle de MP em plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico. Nossa hipótese é que *i)* o estresse hídrico compromete a capacidade de defesa da planta, e portanto, aumenta severidade da mancha parda do arroz, *ii)* a aplicação de NPsAg atua reduzindo os danos decorrentes da infecção fúngica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Crescimento de Plantas

O experimento foi conduzido em estufa localizada no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com sede em Recife-PE. A temperatura e umidade relativa do ar durante a condução do experimento foram registrados com auxílio *datalogger* (modelo RC-51H, Elitech®). A média geral de temperatura no decorrer do experimento foi de 25,30 °C (média diária mínima, 23,08 °C; média diária máxima, 27,84 °C). Já a média de geral da umidade relativa do ar foi de 85,58% (média diária mínima, 75,44%; média diária máxima, 92,44%). Sementes da cultivar tropical foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 3 min, e lavadas em água destilada por igual período. Em seguida, o semeio foi realizado em bandejas contendo areia autoclavada para a germinação. O transplantio das mudas foi realizado 10 dias após a emergência para vasos plásticos contendo 1 dm³ de solução nutritiva preparada de acordo com Hoagland e Arnon (1950), com algumas modificações como segue: 1,0 mM KNO₃, 0,25 mM NH₄H₂PO₄, 0,1 mM NH₄Cl, 0,5 mM MgSO₄ .7H₂O, 1,0 mM (CaNO₃)₂, 0,3 µM CuSO₄ .5H₂O, 0,33 µM ZnSO₄.7H₂O, 11,5 µM H₃BO₃, 3,5 µM MnCl₂ .4H₂O, 0,1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ .4H₂O, 25 µM de FeSO₄.7H₂O e 25 µM de etilenodiaminotetraacético (EDTA) dissódico. O pH da solução foi aferido e corrigido para 5,5-6,0 diariamente usando soluções de NaOH ou HCl (1 M). A solução nutritiva de cada vaso foi substituída a cada 4 dias.

2.2.Estresse hídrico e inoculação com *B. oryzae*

Plantas de arroz com 45 dias foram submetidas ao estresse osmótico causado por polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), simulando o estresse hídrico. A fim de simular as condições naturais, as plantas foram submetidas ao estresse de forma gradativa. Para isso, foram inicialmente expostas ao potencial osmótico de -0,1 Mpa, sendo dobrado para -0,2 e por fim, -0,4 Mpa, seguindo as recomendações de Kaufmann & Michel (1973) quanto as concentrações de PEG 6000 utilizadas correspondentes ao potencial desejado. Decorridos três dias de estresse hídrico, as plantas voltaram a condição de cultivo anterior para recuperação durante um dia e então, foram inoculadas. Para avaliar o potencial de NPsAg em mitigar os efeitos do estresse hídrico e infecção por *B. oryzae* combinados, as plantas de arroz foram pulverizadas com solução de NPsAg (5 µL L⁻¹, pH ajustado de 6,2). A pulverização foi feita no momento da recuperação do estresse hídrico. A figura 1 ilustra as etapas.

A preservação do patógeno e o preparo do inóculo foram realizados de acordo com Dallagnol et al. (2011). Uma suspensão de conídios de *B. oryzae* (1×10^5 conídios mL⁻¹) foi aplicada como uma névoa fina nas folhas de cada planta até o escoamento, usando um atomizador VL Airbrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL, EUA). Gelatina (1%, p. v⁻¹) foi adicionada à água estéril para auxiliar a adesão dos conídios às folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de neblina com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ durante 24 horas no escuro. Após este período, as plantas foram transferidas para uma câmara clara coberta com plástico transparente com temperatura de 25 ± 30 °C, onde permaneceram até o final do experimento.

2.3.Avaliação da mancha parda

O número de lesões por centímetro quadrado de área foliar (NL), tamanho final da lesão (TL) e a severidade da mancha parda (Sev) foram avaliadas na quinta e sexta folha de cada planta as 48 e 72 horas após a inoculação (hai). O NL foi determinado em três locais escolhidos arbitrariamente em cada folha. O TL (mm) foi medido usando paquímetro digital eletrônico, sendo determinado em 10 lesões medidas em cada folha. A Sev foi quantificada usando uma escala baseada na porcentagem de área foliar doente proposta por (Lenz et al. 2010). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada usando a integração trapezoidal da curva de progresso da MP ao longo do tempo usando a fórmula proposta por (Shaner 1977).

2.4.Determinação dos parâmetros fisiológicos

2.4.1. Potencial hídrico foliar ou total da planta (ψ_w)

O potencial hídrico foliar foi avaliado antes do amanhecer em folhas completamente expandidas com câmara de pressão Scholander (modelo 1515D, PMS instrument Company). A folha destacada foi submetida a uma pressão de fluxo constante até que a extremidade cortada do pecíolo apresentasse um espelhamento, momento em que a seiva estava na iminência de extravasar (Scholander et al. 1965). Sendo os valores da pressão no momento da ocorrência usados nos cálculos.

2.4.2. Fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*)

Parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a* (Fluorescência inicial [F_0]; Fluorescência variável [F_v]; Fluorescência máxima [F_m]; Eficiência quântica do fotossistema II [F_v/F_m]) foram estimados com auxílio de fluorômetro portátil (FluorPen, modelo FP100, Photon

Systems Instrumentes) às 48 e 72 hai. As medições foram feitas na quarta folha (do ápice até a base) de cada planta. O protocolo de determinação da fluorescência foi adaptado de acordo com Souza et al. (2021).

2.4.3. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de Chla, Chlb e carotenóides foram determinadas usando o dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator (Santos et al. 2008). Cinco discos de folhas (0,5 cm de diâmetro) foram coletados as 48 e 72 hai. Os discos coletados foram imersos em tubos de vidro contendo 5 mL de solução saturada de 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 usado como um branco.

2.5.Determinação dos parâmetros bioquímicos

Para todas as análises bioquímicas, as amostras de folhas de uma planta por repetição e tratamento foram coletadas as 0, 48 e 72 hai. As amostras de folhas foram mantidas em N₂ líquido durante a amostragem e armazenadas a -20°C até análises posteriores. As enzimas foram extraídas do material congelado (200 mg de peso fresco), conforme descrito por Nunes-Nesi et al. (2007).

2.5.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e defesa

Para determinar as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), um total de 200 mg de tecido foliar homogeneizado foi moído em pó fino usando um almofariz e pilão ao adicionar nitrogênio líquido. O pó fino foi imediatamente homogeneizado em 2 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% (w 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 de enzima bruto.

A atividade da SOD foi determinada usando o método descrito por Del Longo *et al* (1993), que mede a capacidade do SOD de reduzir fotoquimicamente o azul de p-nitrotetrazólio (NTB). A reação foi iniciada adicionando 40 µl do extrato enzimático bruto a 960 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 10 min. Após a exposição à luz, a luz 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 & Ries, 1977). Para as amostras de controle, a mistura de reação foi mantida no escuro por 10 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 & Fridovich, 1971).

A atividade da POX foi analisada após a determinação colorimétrica da oxidação do pirogalol, de acordo com (Kar & Mishra, 1976). A reação foi iniciada após a adição de 15 µl do extrato enzimático bruto a 985 µl de uma mistura de reação contendo fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. A atividade da POX foi medida pela absorbância 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 & Chance, 1954). Essas atividades enzimáticas foram expressas com base em proteínas e sua concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

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 100 µL de extrato enzimático bruto a 0,9 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 M⁻¹cm⁻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).

2.5.2. Determinação do conteúdo relativo de Prolina

O conteúdo de prolina foi determinado de acordo com o método proposto por (BATES, 1973), sendo macerados 100 mg de tecido foliar em 5 mL de ácido sulfosalicílico (3%). A mistura foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos. Em seguida, foi coletado 1 mL do sobrenadante para tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido acético glacial e 1 mL de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6M). As amostras foram incubadas a 100 °C por 60 min, e em seguida, transferidas para gelo. Após a

incubação foram acrescentados 2 mL de tolueno a mistura reacional, e agitados em vórtex por 20 segundos para separação das fases. O cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizado a leitura por espectrofotometria (520 nm), usando o tolueno como branco. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de prolina foi determinada usando uma curva padrão e expressa em μmol de prolina g^{-1} peso fresco.

2.6.Delineamento experimental e análise estatística

O estudo em casa de vegetação consistiu em experimento em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo o primeiro fator época de avaliação (0, 48 e 72 hai), o segundo fator, a inoculação (plantas não inoculadas e inoculadas com *B. oryzae*) e o terceiro, o estresse hídrico (plantas com e sem estresse hídrico), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso contendo quatro plantas. O experimento foi repetido uma vez. 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 um teste t ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS (v. 6.12; SAS Institute, Inc.).

3. RESULTADOS

Os efeitos isolados dos fatores época de avaliação, inoculação e estresse hídrico, bem como as interações desses sobre os parâmetros epidemiológicos, fisiológicos e bioquímicos estão representados nas Tabelas 1 e 2. Para todas as variáveis epidemiológicas foram observadas reduções significativas entre plantas previamente tratadas e não tratadas com PEG6000. O número de lesões, tamanho de lesões, severidade e AACPD foram, respectivamente, 16, 20, 22 e 10% inferiores nas plantas que sofreram estresse hídrico (+PEG6000) às 72 hai em relação as plantas que não sofreram estresse por seca (-PEG6000) (Fig. 2).

A infecção por *B. oryzae* reduziu significativamente em 39 e 58% os teores de clorofila *a*, 36 e 54% de clorofila *b* e 25 e 24% de carotenoides às 48 e 72 hai, respectivamente. Em contrapartida, as folhas das plantas INOC+PEG6000 apresentaram teores mais elevados de pigmentos em relação as plantas INOC-PEG6000 às 72 hai, sendo 16, 34 e 34% para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente (Fig. 3). O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), parâmetro da fluorescência da clorofila *a* se apresenta na Fig. 4. Na ausência de infecção, a relação F_v/F_m não foi significativamente afetada nas plantas +PEG6000 e os valores médios ficaram próximos de 0,81, indicando que o estresse hídrico isolado não

acarretou fotoinibição crônica. No entanto, reduções de 49 e 39% foram observadas como resultado do estresse isolado da infecção por *B. oryzae* às 48 e 72 hai, respectivamente, em relação as plantas NI. Similarmente, as plantas INOC-PEG6000 apresentaram redução de 37 e 26% às 48 e 72 hai, respectivamente, em relação as plantas INOC+PEG6000.

Analisando o potencial hídrico observaram-se mudanças significativas em resposta ao estresse hídrico. As médias foram significativamente menores em plantas tratadas com +PEG6000 quando comparadas as plantas não tratadas, sendo a magnitude de redução superior a 73 e 66% para plantas NI e INOC, respectivamente (Fig. 5). As atividades das enzimas não registraram variações entre plantas -PEG6000 e +PEG6000 na ausência de inoculação, com exceção para FAL as 0 hai. Todas as enzimas estudadas registraram o mesmo padrão geral de atividade crescente em resposta ao efeito combinado de infecção por *B. oryzae* e estresse hídrico nas plantas de arroz quando comparado aos seus pares controle (Fig. 6). Os resultados revelaram que nas plantas INOC+PEG6000 a atividade de SOD foi 23% superior às 72 hai em relação as plantas INOC-PEG6000. Para POX, o aumento foi respectivamente, de 37 e 25 % às 48 e 72 hai. Para esse mesmo período, a FAL registrou aumento de 53 e 41%, indicando ativação das rotas associadas ao metabolismo secundário.

Sob a ocorrência simultânea de estresse hídrico e infecção por *B. oryzae*, o acúmulo de prolina aumentou significativamente, atingindo níveis mais elevados em 31% nas plantas INOC+PEG6000 em relação as plantas NI+PEG6000. Para plantas INOC-PEG600 esse aumento foi de 40% em relação ao controle NI-PEG6000 (Fig. 7). O efeito do tratamento com NPs nas plantas de arroz submetidas a estresse hídrico e infecção por *B. oryzae* se encontra na Fig. 8. Os dados revelam que a pulverização de NPsAg em plantas +PEG6000 reduziu significativamente os parâmetros epidemiológicos da mancha parda. A severidade, AACPD, tamanho de lesões e número de lesões foram reduzidas em 86, 89, 56 e 83%, respectivamente, quando comparadas as plantas +PEG6000 -NPsAg.

4. DISCUSSÃO

As plantas são frequentemente expostas a diferentes estresses abióticos e bióticos, que podem ocorrer simultânea ou sequencialmente. No presente estudo, buscamos entender o efeito combinado do estresse hídrico e infecção por *B. oryzae* em plantas de arroz em nível fisiológico e bioquímico. Adicionalmente, exploramos o potencial de NPsAg em reduzir a MP em plantas de arroz que foram submetidas ao estresse hídrico. Contrariando as hipóteses levantadas, observamos redução nos parâmetros epidemiológicos da mancha parda do arroz em plantas submetidas a estresse hídrico. De fato, reduções significativas foram observadas no número e

1 tamanho de lesões, bem como severidade e AACPD. A hipótese de que plantas previamente
2 expostas a estresse abiótico pode conferir resistência a estresse subsequente por patógenos foi
3 proposta anteriormente por Ayres (1984). A premissa principal surgiu do fato de que alguns
4 mecanismos que levam a adaptação ao estresse podem ter um elo comum por meio da proteção
5 da eficiência metabólica da planta sob esses estresses (Ramegowda & Senthil-Kumar, 2015).

6 Plantas expostas a estresse hídrico leve induzem a biossíntese de ABA que levam a uma
7 série de respostas moleculares e celulares, entre as quais as mais conhecidas são a expressão de
8 genes relacionados ao estresse e fechamento estomático. O fechamento estomático não apenas
9 leva a conservação da água durante a seca, mas também serve como um mecanismo de defesa
10 a entrada de patógenos. Além disso, o ABA pode interagir de forma sinérgica com outros
11 hormônios, como ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) envolvidos na resistência a patógenos
12 necrotróficos (Lee & Luan, 2012; Son et al., 2022).

13 Pesquisas anteriores demonstraram que a aclimação prévia a seca em plantas de
14 *Nicotiana benthamiana* conferiu tolerância ao fungo necrotrófico, *Sclerotinia sclerotiorum*, e
15 ao patógeno bacteriano hemibiotrófico, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Ramegowda et al.,
16 2013). Mais recentemente, um estudo conduzido em porta enxerto de abacate demonstrou que
17 o estresse hídrico leve promoveu tolerância a *Rosellinia necatrix*, agente causal da podridão
18 branca da raiz. Os resultados observados da expressão diferencial de genes demonstram que
19 vias envolvidas na resposta do abacate ao estresse hídrico levam a indução de genes expressos
20 em interações incompatíveis contra patógenos (Martínez-Ferri et al., 2019). O mesmo foi
21 observado em plantas de oliveira previamente submetidas a estresse por seca que se mostraram
22 tolerantes a *Xylella fastidiosa*, devido ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs),
23 que atua como mensageiro secundário na transdução de sinal e desencadeia uma maior resposta
24 de defesa contra o patógeno (De Pascali et al., 2019).

25 A capacidade fotossintética das folhas de arroz infectadas por *B. oryzae* foi prejudicada
26 com base na menor eficiência do fotossistema II nestas plantas. Curiosamente, as disfunções
27 no nível fotoquímico causadas pela doença foram maiores para as plantas que não sofreram
28 com estresse hídrico. Os valores médios de F_v/F_m foram próximos de 0,65 para plantas
29 infectadas em combinação com estresse hídrico, sugerindo leve fotoinibição crônica à
30 fotossíntese. De fato, essas plantas sofreram menor perda de pigmentos fotossintéticos,
31 especialmente clorofilas *a* e *b*. Estes resultados indicam que o desempenho fotoquímico nestas
32 plantas de arroz foi mais afetado pela infecção que pelo estresse hídrico. Contribuindo para este
33 efeito, os níveis de carotenoides nestas plantas foram maiores, refletindo em uma maior

capacidade destas plantas infectadas em regular seus mecanismos de fotoproteção (Rolfe & Scholes, 2010), resultando em menor dano foto-oxidativo. O menor nível de perturbação fotoquímico para plantas infectadas em combinação com estresse hídrico sugere uma maior oferta de ATP e, conseqüentemente, maior poder de assimilação de CO₂. A maior assimilação também foi otimizada devido a manutenção de área foliar nestas plantas, permitindo a maior interceptação da luz.

Os efeitos observados sobre os parâmetros fotossintéticos foram mais influenciados pela infecção de *B. oryzae* do que o estresse hídrico, este resultado era esperado uma vez que este último não interfere diretamente sobre a integridade foliar. Por outro lado, o efeito do tratamento abiótico reduziu significativamente o potencial hídrico das plantas independente da presença do patógeno. Níveis mais baixos de potencial hídrico foliar observados nas plantas sobre estresse hídrico comprometem o sistema de transporte hidráulico da planta, uma vez que podem limitar ou cessar o transporte nos vasos do xilema (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017).

Particularmente, a geração de EROs tem sido sugerida como um processo central na mediação das respostas ao estresse biótico e abiótico. EROs, como radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, são essenciais para induzir a resposta de hipersensibilidade, morte celular programada e fortalecimento das paredes celulares das plantas. Várias enzimas medeiam a desintoxicação de EROs para regular o equilíbrio entre sua produção e eliminação. Superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POX), por exemplo, atuam como a primeira linha de defesa na eliminação de EROs (Basu et al., 2017; Pospíšil, 2016; Zhang & Sonnewald, 2017). Em nosso estudo, aumento significativo na atividade de tais enzimas foram registrados para as plantas infectadas por *B. oryzae*, sendo os maiores valores observados em plantas que sofreram estresse combinado de seca e infecção fúngica. Além disso, aumentos consideráveis nos níveis de prolina foram observados nas plantas sob infecção, que atua como um antioxidante não enzimático e desempenha um papel importante na eliminação de EROs. Esses resultados sugerem que o sistema multidimensional de defesa antioxidante manteve a homeostase redox em plantas de arroz, o que resultou na redução da severidade da doença em tais condições.

No presente estudo, a atividade da FAL foi significativamente aumentada em resposta as tensões individuais de estresse hídrico e infecção por *B. oryzae*, bem como na combinação dessas tensões, indicando a importância da via dos fenilpropanóides na redução da severidade da doença. Aqui, a alta atividade da FAL nas plantas que sofreram com seca foi de grande

importância, pois a enzima catalisa a conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é a primeira etapa na via fenilpropanóide e um importante ponto de regulação na interseção do metabolismo primário e secundário. 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 & Paiva, 1995). Hipoteticamente, o aumento na atividade da FAL nas plantas sob estresse hídrico desencadeou respostas de defesa, com possível aumento na deposição de lignina, atuando como barreira estrutural a infecção fúngica, como verificado pelo menor número de lesões, severidade da doença e AACPD.

Em nosso estudo anterior, avaliamos o potencial de aplicação de NPsAg no manejo da mancha parda. Em geral, a infecção por *B. oryzae* foi reduzida e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram preservados. No controle de doenças do arroz, seu potencial já foi relatado para *Aspergillus flavus* (Ejaz et al., 2018), *Xanthomonas oryzae* (Ahmed et al., 2020; Mishra et al., 2020; Namburi et al., 2021), *Acidovorax oryzae* (Ibrahim et al., 2019) e *Rhizoctonia solani* (Kora et al., 2020). Outros estudos demonstraram o efeito fitoestimulador de NPsAg na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de arroz (GUPTA et al., 2018). Assim como em diferentes estágios do ciclo de vida da cultura, mostrando considerável aumento no perfilhamento, biomassa aérea e rendimento de grãos (Yan et al., 2022). No entanto, o efeito em plantas de arroz submetidas a estresse hídrico e infecção por *B. oryzae* ainda não havia sido demonstrado. Nossos resultados sugerem que a aplicação de NPsAg é eficiente na mitigação de MP mesmo submetidas ao estresse hídrico. Aqui, a proteção conferida pode ser resultado de uma maior eficiência oxirredutora de EROs e promoção de metabólitos secundários atuantes na defesa vegetal conforme demonstrado em estudos anteriores (Abbasi & Jamei, 2019; Batool et al., 2021; Sharma et al., 2012).

A utilização de nanopartículas na agricultura vem acompanhada de preocupações em relação ao acúmulo e liberação dessas NPs no meio ambiente, e na segurança alimentar e dos ecossistemas. Mais recentemente, Yan et al. (2022) conduzindo estudos em arroz, demonstraram que NPsAg a 1 e 10 mg kg⁻¹ aplicadas via solo, se acumularam nas raízes e translocaram até a parte aérea das plantas. No entanto, o acúmulo nas sementes ocorreu, principalmente, na casca e no farelo, não atingindo os tecidos comestíveis (arroz polido). Destacamos aqui, que a concentração usada em nosso estudo (5µL L⁻¹) é significativamente inferior a estudos anteriores, sugerindo baixo risco para a dieta humana.

1 Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram que as plantas de arroz
2 submetidas a estresse hídrico leve interferiram negativamente na severidade da mancha parda
3 do arroz. Este estresse abiótico prévio a inoculação aumentou os teores de antioxidantes
4 enzimáticos, além de promover maior atividade da FAL. Por fim, o tratamento foliar com
5 NPsAg reduziu os parâmetros epidemiológicos da mancha parda do arroz em todas as
6 combinações de estresse, comprovando mais uma vez a sua efetividade de controle contra
7 patógenos. Estudos futuros podem ser realizados objetivando avaliar o efeito concomitante dos
8 estresses bióticos e abióticos sobre a planta de arroz, sendo importante para simular períodos
9 de maiores secas no campo e sua interferência direta sobre a infecção de *B. oryzae*.

REFERÊNCIAS

- Abbasi F, Jamei R (2019) Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate on Antioxidant Responses in *Echium amoenum*. Russian Journal of Plant Physiology 66(3): 488–494
- Achuo EA, Prinsen E, Höfte M (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. Plant Pathology 55: 178–186
- Ahmed F, Javed B, Razzaq A, Mashwani ZUR (2021) Applications of copper and silver nanoparticles on wheat plants to induce drought tolerance and increase yield. IET Nanobiotechnology 15(1): 68–78
- Ahmed T, et al. (2020) Silver nanoparticles synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice. Pathogens 9(3): 160
- Al-Otibi F, et al. (2021) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Malva parviflora* and their antifungal activity. Saudi Journal of Biological Sciences 28(4): 2229–2235
- Ayres PG (1984) The interaction between environmental stress injury and biotic disease physiology. Annual Review of Phytopathology 22(1): 53–75
- Bahrami-Teimoori B, Nikparast Y, Hojatianfar M, Akhlaghi M, Ghorbani R, Pourianfar HR (2017) Characterisation and antifungal activity of silver nanoparticles biologically synthesised by *Amaranthus retroflexus* leaf extract. Journal of Experimental Nanoscience 12(1): 129–139
- Barnwal MK, et al. (2013) A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. European Journal of Plant Pathology 136:443–457
- Basu S, et al. (2017) Comprehensive physiological analyses and reactive oxygen species profiling in drought tolerant rice genotypes under salinity stress. Physiology and Molecular Biology of Plants 23(4): 837–850
- Bates LS, Waldren RA, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil 39: 205–207
- Batool SU, et al. (2021) Exogenous Applications of Bio-fabricated Silver Nanoparticles to Improve Biochemical, Antioxidant, Fatty Acid and Secondary Metabolite Contents of Sunflower. Nanomaterials 11(7): 1750
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44(1): 276–287
- Bocate KP, et al. (2019) Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. International Journal of Food Microbiology 291: 79–86
- Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254
- Chen H (2018) Metal based nanoparticles in agricultural system: Behavior, transport, and interaction with plants. Chemical Speciation and Bioavailability 30(1): 123–134
- Cruz-Luna AR, Cruz-Martínez H, Vásquez-López A, Medina DI (2021). Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: Current advances and future directions. Journal of Fungi 7(12): 1033
- Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Frontiers in microbiology 7: 1831
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Martins SC, Cavatte PC, DaMatta FM (2011). Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. Australasian Plant Pathology 40(4): 360–365
- Danish M et al. (2022) Nano-pesticidal potential of *Cassia fistula* (L.) leaf synthesized silver nanoparticles

- (Ag@CfL-NPs): Deciphering the phytopathogenic inhibition and growth augmentation in *Solanum lycopersicum* (L.). *Frontiers in Microbiology* 13: 1–18
- 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
- De Pascali M et al. (2019) Molecular effects of *Xylella fastidiosa* and drought combined stress in olive trees. *Plants* 8(11): 437
- Debona D et al. (2016) Physiological changes promoted by a strobilurin fungicide in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130: 8–16
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell* 7(7): 1085
- Ejaz M et al. (2018) Effect of silver nanoparticles and silver nitrate on growth of rice under biotic stress. *IET Nanobiotechnology* 12(7): 927–932
- Elamawi R, El-Shafey RA (2013) Inhibition effects of silver nanoparticles against rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea*. *Egyptian Journal of Agricultural Research* 91(4): 1271–1283
- Ghanbary E et al. (2021) Drought and pathogen effects on survival, leaf physiology, oxidative damage, and defense in two middle eastern oak species. *Forests* 12(2): 247
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59(2): 309–314
- Guo Y, Liu L, Bi Y (2007) Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in China cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *Int J Food Sci Tech* 42:1012–1018
- Gupta SD, Agarwal A, Pradhan S (2018) Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (NPsAg) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161: 624–633
- Ibrahim E. et al. (2019) Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. *RSC Advances* 9(50): 29293–29299
- Jeyasri R et al. (2021) An overview of abiotic stress in cereal crops: Negative impacts, regulation, biotechnology and integrated omics. *Plants* 10(7): 1472
- Jin Y, Yang H, Wei Z, Ma H, Ge X (2013) Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. *Molecular Plant* 6(5): 1630–1645
- Kanaujiya D, Kumar V, Dwivedi SK, Prasad G (2020) Photobiosynthesis of silver nanoparticle using extract of *Aspergillus flavus* CR500: its characterization, antifungal activity and mechanism against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Cluster Science* 31(5): 1041–1050
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57(2): 315–319
- Kaufmann M, Michel B (1973) The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant physiology* 51: 914–916
- Khush GS (2005) What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59(1): 1–6
- Kora AJ, Mounika J, Jagadeeshwar R (2020) Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An in vitro fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. *Fungal Biology* 124(7): 671–681

- Kumar S et al. (2023) Redox imbalance disrupts spikelet fertility in rice: A study under stage-specific and multi-stage drought in eastern Indo-Gangetic plain. *Environmental and Experimental Botany* 205: 105121
- Kumari M et al. (2019) An insight into the mechanism of antifungal activity of biogenic nanoparticles than their chemical counterparts. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 157: 45–52
- Lee SC, Luan S (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, cell & environment* 35(1): 53-60
- Lenz G, Balardin RS, Dalla Corte G, Marques LN, Debona D (2010) Diagrammatic scale for assessment of rice brown spot severity. *Ciencia Rural* 40(4): 752-759
- Maehly AC, Chance B (1954) The Assay of Catalase and Peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis* 1: 358–423
- Malandrakis AA, Kavroulakis N, Chrysikopoulos CV (2020) Synergy between Cu-NPs and fungicides against *Botrytis cinerea*. *Science of the Total Environment* 703: 135557
- Martínez-Ferri E, Moreno-Ortega G, Van den Berg N, Pliego C (2019) Mild water stress-induced priming enhance tolerance to *Rosellinia necatrix* in susceptible avocado rootstocks. *BMC plant biology* 19(1): 1-15
- Martínez-Vilalta J, Garcia-Forner N (2017) Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant, cell & environment* 40(6): 962-976
- Marwein R et al. (2022) Transcriptome-wide analysis of North-East Indian rice cultivars in response to *Bipolaris oryzae* infection revealed the importance of early response to the pathogen in suppressing the disease progression. *Gene* 809: 146049
- Mishra S et al. (2014) Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS ONE* 9(5): e97881
- Mishra S, Singh BR, Naqvi AH, Singh HB (2017) Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens. *Scientific reports* 7(1): 1-15
- Mishra S, Yang X, Ray S, Fraceto LF, Singh HB (2020) 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* 36: 1-10
- Mizobuchi R, Fukuoka S, Tsushima S, Yano M, Sato H (2016) QTLs for resistance to major rice diseases exacerbated by global warming: brown spot, bacterial seedling rot, and bacterial grain rot. *Rice* 9(1): 1-12
- Modena MM, Rühle B, Burg TP, Wuttke S (2019) Nanoparticle characterization: what to measure? *Advanced Materials* 31(32): 1901556
- Nadarajah KK (2020) ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences* 21(15): 5208
- Namburi KR, Kora AJ, Chetukuri A, Kota VSMK (2021) Biogenic silver nanoparticles as an antibacterial agent against bacterial leaf blight causing rice phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44(9): 1975-1988
- Nayantara, Kaur P (2018) Biosynthesis of nanoparticles using eco-friendly factories and their role in plant pathogenicity: a review. *Biotechnology Research and Innovation* 2(1): 63–73
- Nisar P, Ali N, Rahman L, Ali M, Shinwari ZK (2019) Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 24: 929-941

- Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M (2017) Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in plant science* 8: 537
- Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 6: 723
- Pospíšil P (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in plant science* 7: 1950
- Radha B et al. (2023) Physiological and molecular implications of multiple abiotic stresses on yield and quality of rice. *Frontiers in Plant Science* 13: 996514
- Rajan R, Chandran K, Harper SL, Yun SI, Kalaichelvan PT (2015) Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products* 70: 356-373
- Ramegowda V et al. (2013) Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5): 9497–9513
- Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2015) The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of plant physiology* 176: 47-54
- Savary S et al. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3(3): 430–439
- Savary S, Castilla NP, Elazegui FA, Teng PS (2005) Multiple effects of two drivers of agricultural change, labour shortage and water scarcity, on rice pest profiles in tropical Asia. *Field Crops Research* 91(2-3): 263-271
- Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT (1965) Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148(3668): 339-346
- Shaner G (1977) The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 77(8): 1051
- Sharma P et al. (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(8): 2225–2233
- Son S, Im JH, Song G, Nam S, Park SR (2022) OsWRKY114 inhibits ABA-induced susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *International Journal of Molecular Sciences* 23(15): 8825
- Souza AAB, Nascimento CWA, Souza ER (2021) Mineral composition, chlorophyll fluorescence and zinc biofortification in *Vigna unguiculata* fertilized with bulk and nanoparticulate zinc oxides. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(12): 159
- Stephen K, Beena R, Kiran AG, Shaniya S, Saravanan R (2022) Changes in physiological traits and expression of key genes involved in sugar signaling pathway in rice under high temperature stress. *3 Biotech* 12(9): 183
- 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(3): 307–313
- Yan X et al. (2022) Rice exposure to silver nanoparticles in a life cycle study: effect of dose responses on grain metabolomic profile, yield, and soil bacteria. *Environmental Science: Nano* 9(6): 2195-2206
- Zhang H, Sonnewald U (2017) Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *Plant Journal* 90(5): 839–855

Zucker M (1965) Induction of phenylalanine ammonia deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissues. *Plant Physiology* 40(5): 779

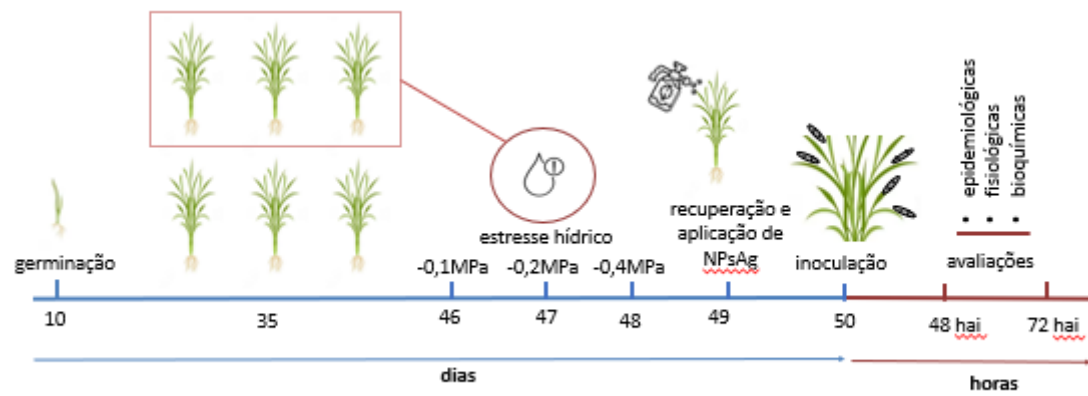


Figura 1. Ilustração das etapas do experimento envolvendo o estresse hídrico, tratamento com NPsAg e inoculação de *B. oryzae*.

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos época de avaliação (EA), inoculação (I) e estresse hídrico (EH) sobre a severidade (Sev), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), tamanho de lesões (TL), número de lesões (NL), fenilalanina amônia-liase (FAL), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), potencial hídrico (Pot. Hid.), prolina, eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b*, (Chl *b*) e carotenoides.

^a Variáveis	^b F valores						
	EA	I	EH	EA × I	EA × EH	I × EH	EA × I × EH
Sev	19,59***	-	8,33*	-	-	6,26*	-
AACPD	-	-	9,11*	-	-	-	-
TL	-	-	8,70**	-	-	-	-
NL	-	-	8,87**	-	-	-	-
FAL	19,37***	72,69***	29,99***	1,41 ^{ns}	1,49 ^{ns}	27,56***	0,10 ^{ns}
SOD	4,99*	25,22***	6,25*	1,97 ^{ns}	3,69*	0,70 ^{ns}	1,15 ^{ns}
POX	83,92***	843,32***	22,40***	0,15 ^{ns}	4,55*	63,78***	1,63 ^{ns}
Pot. Hid.	25,14***	13,06**	39,02***	1,67 ^{ns}	22,40***	0,29 ^{ns}	6,97*
Prolina	-	11,14**	2,29 ^{ns}	-	-	0,49 ^{ns}	-
F_v/F_m	0,16 ^{ns}	139,58***	19,59***	3,94 ^{ns}	2,82 ^{ns}	34,71***	0 ^{ns}
Chl <i>a</i>	54,86***	1222,05***	4,19 ^{ns}	84,07***	0,05 ^{ns}	0,03 ^{ns}	7,26 ^{ns}
Chl <i>b</i>	33,58***	218,07***	1497***	4,67*	3,42 ^{ns}	5,33*	2,59 ^{ns}
Carotenoides	20,04***	139,69***	4,67*	13,20**	0 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,03 ^{ns}

^a Efeito principal e efeito da interação dos fatores Época de amostragem (EA; 48 e 72 horas após a inoculação), Inoculação de Plantas (I; não inoculada e inoculada com *B. oryzae*) e Estresse Hídrico (EH) (sem e com EH).

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

Tabela 2. Análise de variância dos efeitos estresse hídrico (EH) e tratamento com NPsAg (NPsAg) sobre a severidade (Sev), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), tamanho de lesões (TL), número de lesões (NL).

^a Variáveis	^b F valores		
	NPs Ag	EH	NPsAg × EH
Sev	422,96***	2,47 ^{ns}	2,61 ^{ns}
AACPD	968,81***	4,60*	2,93 ^{ns}
TL	168,76***	16,09**	1,84 ^{ns}
NL	482,17***	12,06**	2,01 ^{ns}

^a Efeito principal e efeito da interação dos fatores Estresse Hídrico (EH) (sem e com EH) e Nanopartículas de Prata (NPs Ag sem e com tratamento).

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

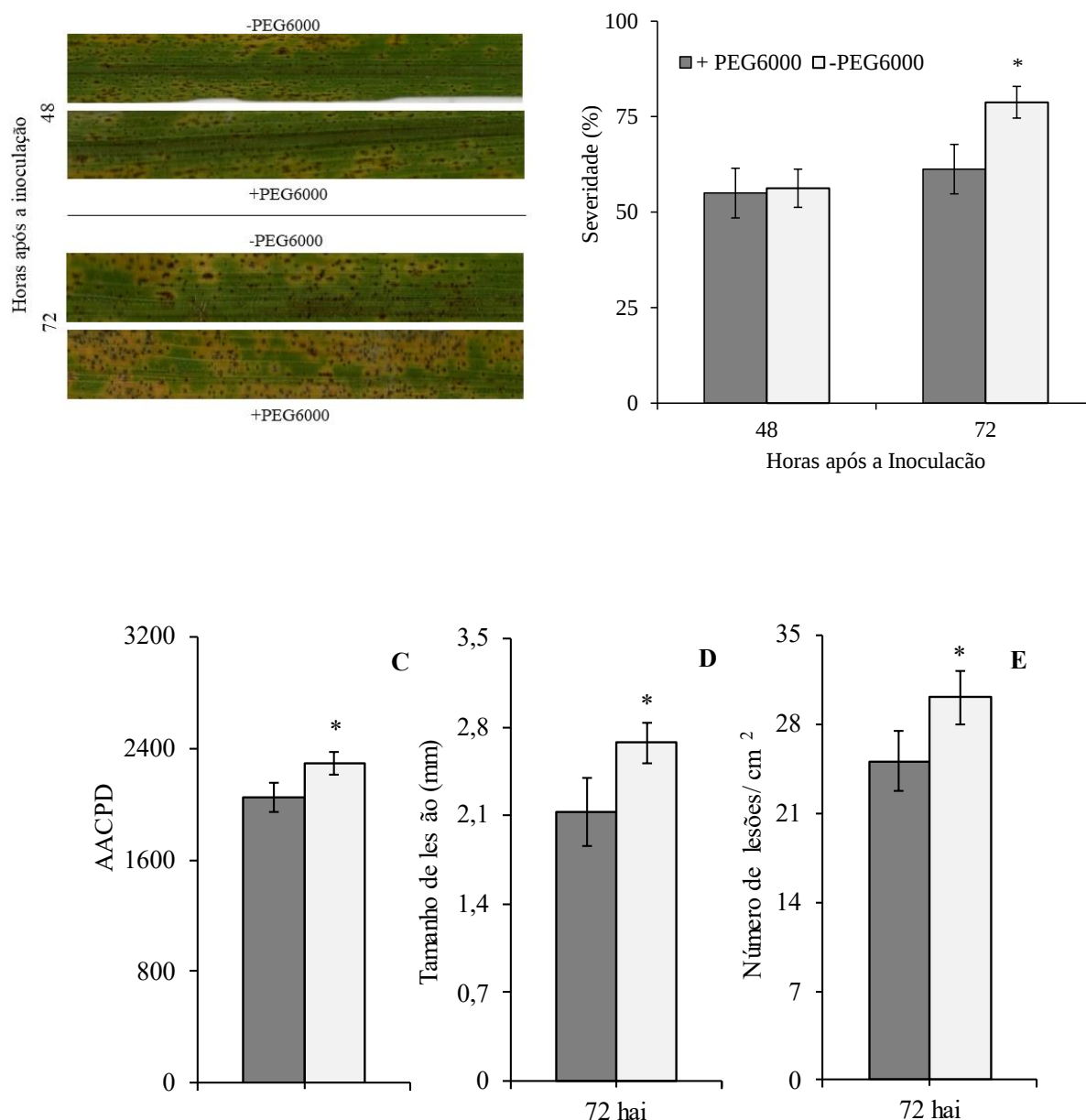


Figura 2. Sintomas da mancha parda do arroz as 48 e 72 hai em plantas não submetidas (-PEG6000) e submetidas a estresse hídrico (+PEG6000) (A). Severidade da doença (B), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (C), tamanho de lesões (D) e número de lesões sem PEG6000 ou com PEG6000 (E). As médias dos tratamentos que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o 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 os desvios padrão das médias. $n = 10$

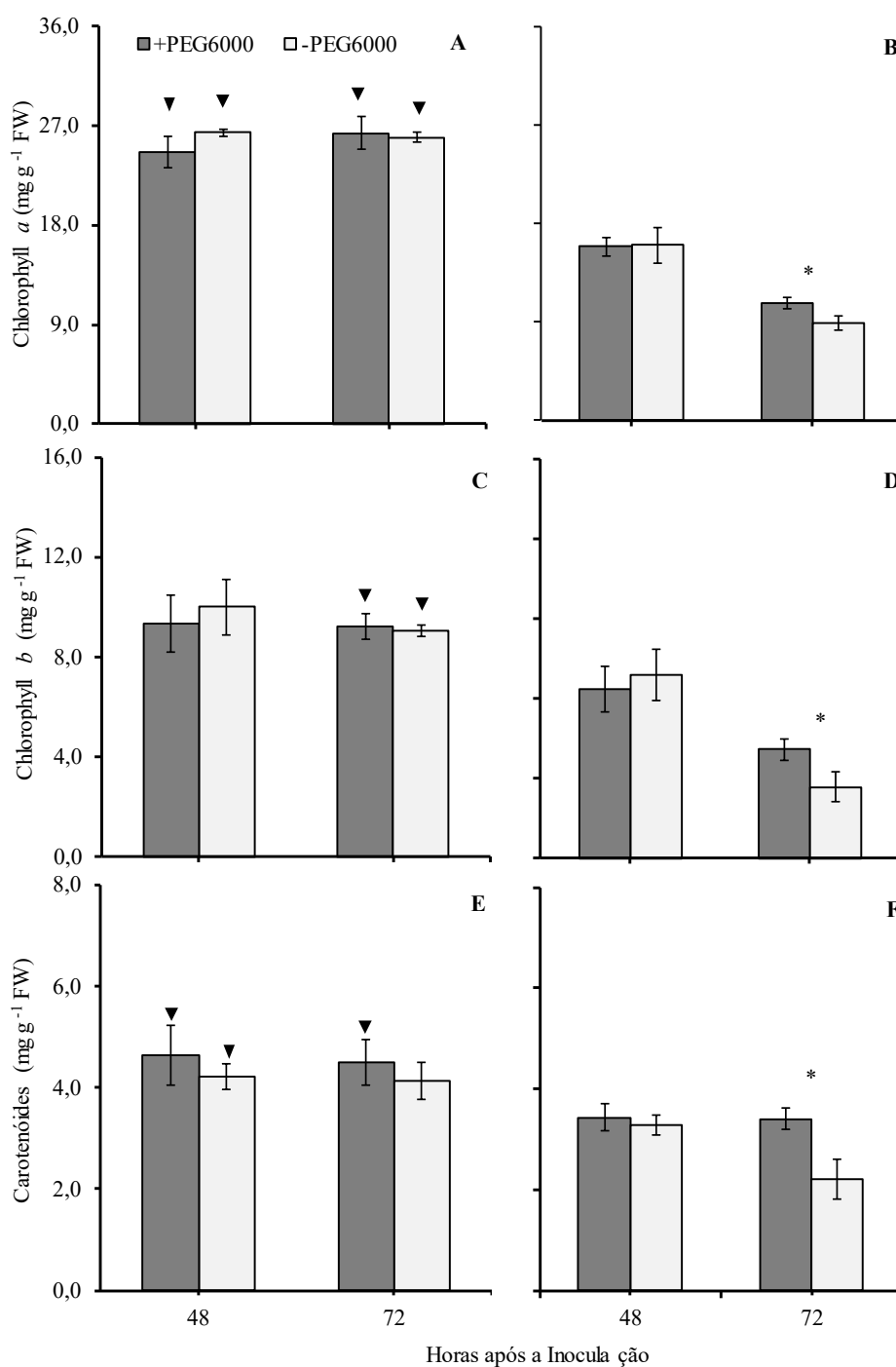


Figura 3. Concentração de clorofila (Chl) *a* (A e B), Chl *b* (C e D) e carotenoides (E e F) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz submetidas (+PEG6000) ou não (-PEG6000) a estresse hídrico. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos 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. $n = 5$

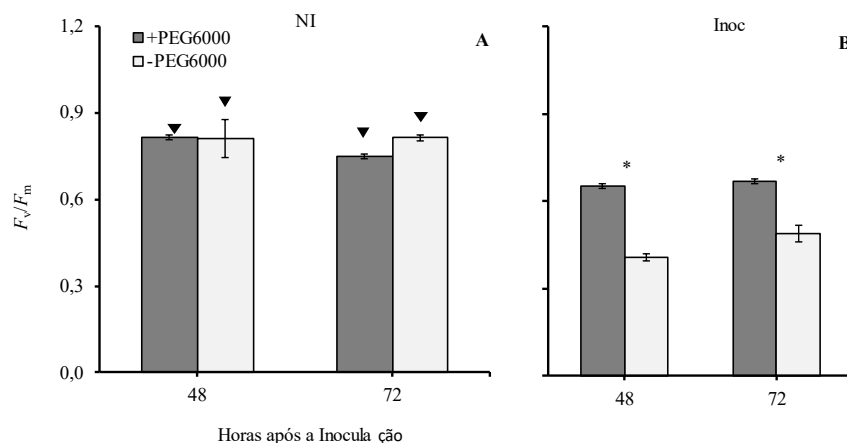


Figura 4. Eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) determinada a partir de folhas de plantas de arroz submetidas (+PEG6000) ou não (-PEG6000) a estresse hídrico. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

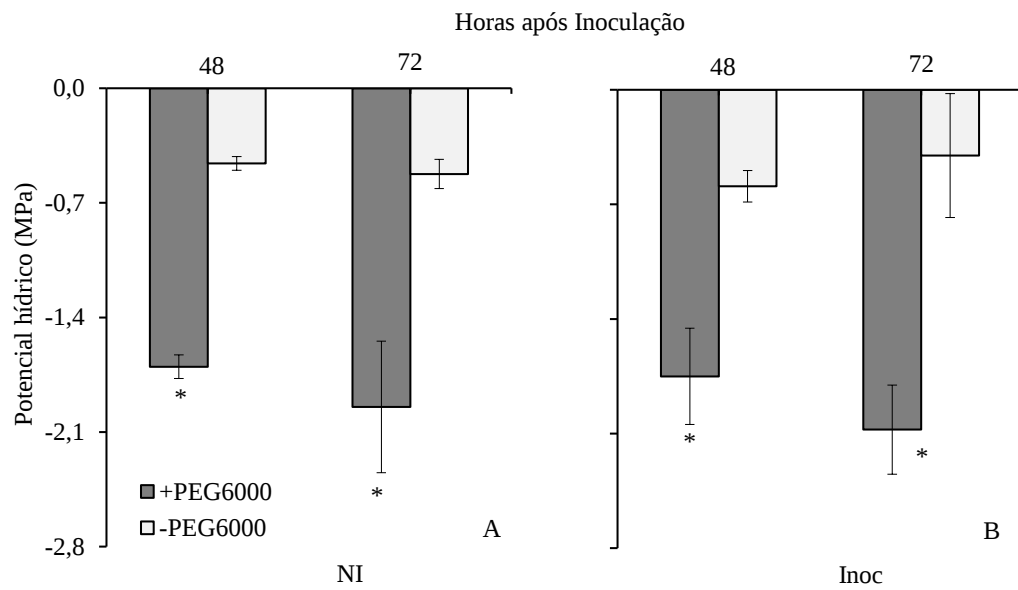


Figura 5. Potencial hídrico foliar determinado a partir de folhas de plantas de arroz submetidas (+PEG6000) ou não (-PEG6000) a estresse hídrico. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

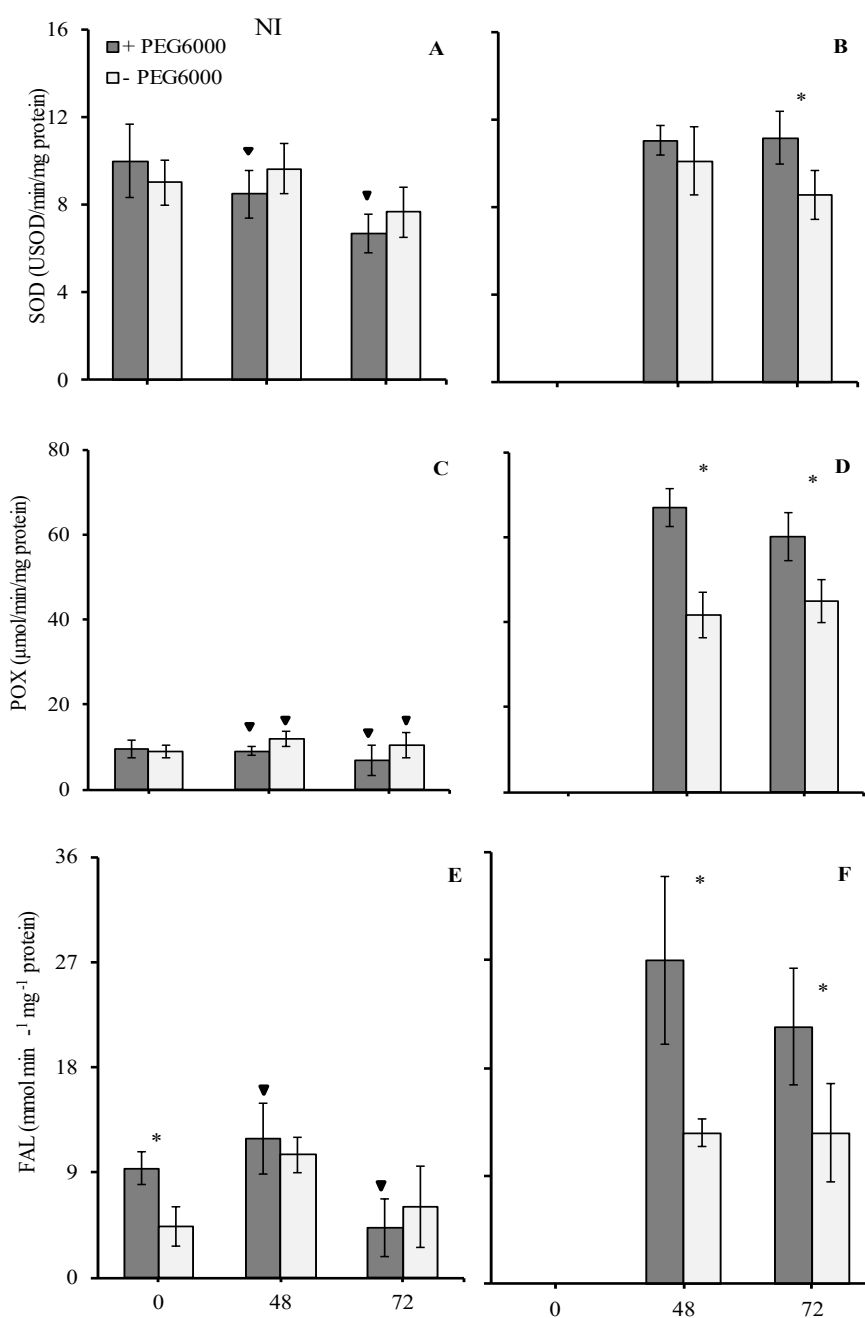


Figura 6. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidase (POX) (C e D) e FAL (E e F) determinadas a partir de folhas de plantas de arroz submetidas (+PEG6000) ou não (-PEG6000) a estresse hídrico. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos 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 de *t*. As barras representam o desvio padrão das médias. $n = 5$

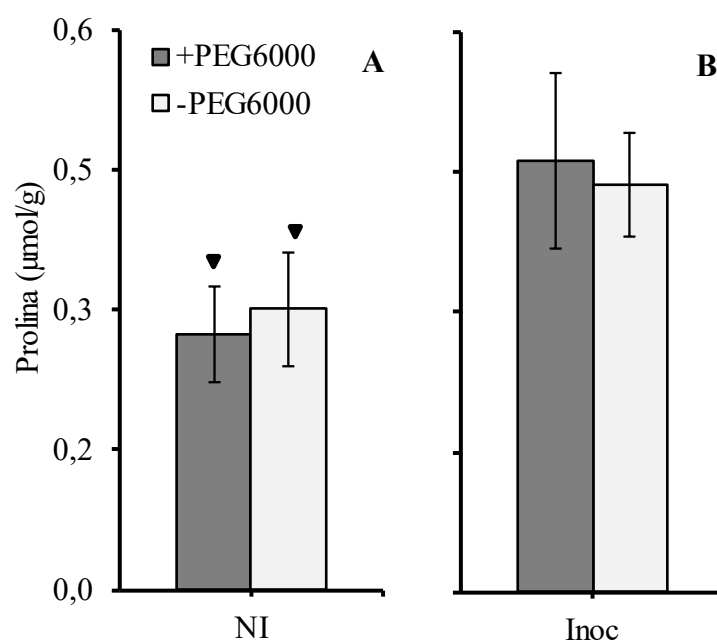


Figura 7. Teor de prolina determinado as 72 hai a partir de folhas de plantas de arroz submetidas (+PEG6000) ou não (-PEG6000) a estresse hídrico. Plantas não foram inoculadas (NI) ou inoculadas (Inoc) com *Bipolaris oryzae*. As médias dos tratamentos dentro de cada tempo de avaliação que são seguidas 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. $n = 5$

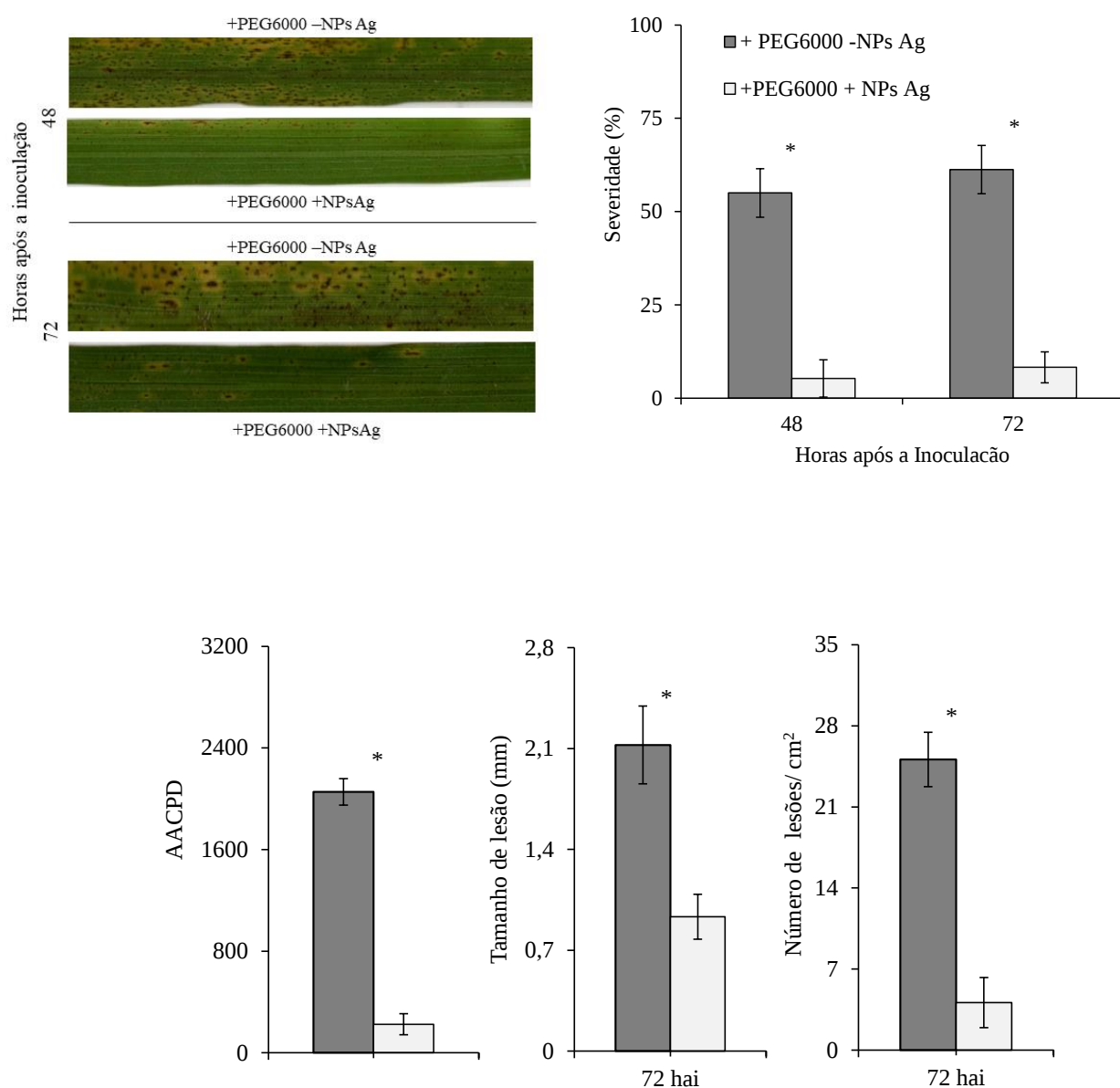


Figura 8. Sintomas da mancha parda do arroz as 48 e 72 hai em plantas submetidas a estresse hídrico e pulverizadas (+NPsAg) ou não com NPsAg (-NPsAg) (VIA). Severidade da doença (VIB), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (VIC), tamanho de lesões (VID) e número de lesões sem NPsAg ou com NPsAg (VIE). As médias dos tratamentos que são seguidas por asteriscos (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de 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 os desvios padrão das médias. $n = 10$

CAPÍTULO IV**Conclusões Gerais**

CONCLUSÕES GERAIS

- Nanopartículas de prata inibem eficientemente o desenvolvimento de *Bipolaris oryzae* *in vitro*, e reduzem a intensidade da mancha parda em arroz *in vivo*. Consequentemente, permitem a preservação do processo fotossintético, aliado a menor estresse oxidativo e maior atividade da FAL.
- Plantas de arroz submetidas a estresse hídrico leve interfere negativamente na severidade da mancha parda. Este estresse abiótico prévio a inoculação aumenta os teores de antioxidantes enzimáticos, além de promover maior atividade da FAL. Contudo, o estresse hídrico promove dano ao potencial hídrico da planta.
- O tratamento foliar com Nanopartículas de prata reduz os parâmetros epidemiológicos da mancha parda do arroz em todas as combinações de estresse, comprovando a sua efetividade de controle contra patógenos.