

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Aumento na concentração do CO₂ atmosférico afeta
patossistemas do arroz, e respostas bioquímicas e
fisiológicas contra *Bipolaris oryzae***

Keilor da Rosa Dorneles

Pelotas, 2019

Keilor da Rosa Dorneles

Aumento na concentração do CO₂ atmosférico afeta patossistemas do arroz, e respostas bioquímicas e fisiológicas contra *Bipolaris oryzae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia)

Orientador:

Dr. Leandro José Dallagnol

Coorientador:

Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D713a Dorneles, Keilor da Rosa

Aumento na concentração do CO₂ atmosférico afeta patossistemas do arroz, e respostas bioquímicas e fisiológicas contra *Bipolaris oryzae* / Keilor da Rosa Dorneles ; Leandro José Dallagnol, orientador ; Sidnei Deuner, coorientador. — Pelotas, 2019.

85 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Oryza sativa*. 2. *Cochliobolus miyabeanus*. 3. Dano celular. 4. Resistência de plantas. 5. Mudanças climáticas. I. Dallagnol, Leandro José, orient. II. Deuner, Sidnei, coorient. III. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Cley Donizeti Martins Nunes, Dr.

Danielle Ribeiro de Barros, Dr^a.

Francislene Angelotti, Dr^a.

Jeronimo Vieira de Araujo Filho, Dr.

Leandro José Dallagnol
(Orientador)

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, pela saúde, proteção, acompanhamento e sabedoria em todos os momentos da caminhada.

A minha família, pelo apoio, carinho, compreensão, incentivo e por entender a minha ausência durante o período.

A Marília Alonso Piva pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo.

Aos amigos de longa data André Zeist, Bruna Pozzebon, e Marlon Bastiani e Vinicius Gehrke pela convivência, conselhos e apoio.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao professor Leandro José Dallagnol, pela amizade, ensinamentos, incentivo, confiança, dedicação e orientação durante essa trajetória.

Ao professor Sidnei Deuner pela coorientação, amizade e ensinamentos.

Ao professor Luis Antônio de Avila e seu orientado de pós-graduação João Paulo Refatti, pelo concedimento das OTCs para a realização dos experimentos e pelos esclarecimentos de manuseio das instalações.

Ao Laboratório de Fungos fitopatogênicos sob coordenação da professora Candida Jacobsen Farias pela disponibilidade de seu laboratório e do isolado de *Bipolaris oryzae*. Ao Laboratório LACEV sob coordenação do professor Gustavo Maia Souza pelo concedimento dos aparelhos para as análises fisiológicas. Ao Laboratório de Anatomia vegetal sob coordenação da professora Juliana Fernando pelas análises anatômicas. Ao Laboratório de Bioquímica vegetal sob coordenação do professor Luciano do Amarante pelas análises de carboidratos. Ao Laboratório de Grãos sob coordenação do professor Nathan Vanier pelas análises de pós colheita. Ao Laboratório de Herbologia sob coordenação dos professores Luis Antônio de Avila e Edinaldo Rabaioli Camargo e também ao seus orientados pelo auxílio e apoio ao longo de toda a execução do projeto.

Aos professores do PPGFs e PPGFV pelos esclarecimentos e ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação Alfonso, Anderson Brunetto, Caroline Neves, Cristiano Belle, Juan Felipe Rivera, Paulo Pazdiora, Priscila Rossatto Meneses, Sílvia Leticia Santos Da Paz Maich, Victoria Moreira, Viviana Gaviria,

Wellington Rodrigues pelo convívio, amizade, companheirismo e auxílio na execução dos trabalhos.

Aos estagiários pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

Aos funcionários Rosária e Sergio pelo convívio, incentivo, amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

As empresas Embrapa e Ricetec pelo fornecimento das sementes de arroz para a realização dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto nº 400897/2014-8.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito do trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

DORNELES, Keilor da Rosa. Aumento na concentração do CO₂ atmosférico afeta patossistemas do arroz, e respostas bioquímicas e fisiológicas contra *Bipolaris oryzae*. 2019. 85f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

O incremento de CO₂ atmosférico é uma das principais variáveis ambientais que podem afetar a interação entre as plantas e os seus respectivos patógenos. Com base nisso, os objetivos foram investigar os efeitos da elevação da concentração do CO₂ atmosférico de 400 ppm para 700 ppm, na severidade da brusone (*Pyricularia oryzae*), mancha parda (*Bipolaris oryzae*), mancha ocular (*Drechslera gigantea*) e da cárie (*Tilletia barclayana*) na cultura do arroz (Capítulo I). Em relação a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae*, foi avaliado em cultivares suscetível (BRS Querência) e resistente (Inov CL) os efeitos do incremento na concentração do CO₂ atmosférico nos mecanismos bioquímicos de defesa (Capítulo II), na anatomia foliar e nas alterações fisiológicas decorrente do processo de infecção por *B. oryzae* nas folhas de plantas de arroz (Capítulo III). Os resultados apresentados nesse estudo demonstram que a elevação da concentração de CO₂ atmosférica causa alterações no comportamento epidemiológico de doenças do arroz variável com o tipo de parasitismo do agente causal. Estas observações foram registradas para a mancha parda e mancha ocular, causadas por patógenos necrotrófico, e para brusone, hemibiotrófico, todavia, sem efeito expressivo sobre a cárie do arroz, biotrófico. Tanto a mancha ocular, quanto a brusone aumentaram a sua severidade em condições de 700 ppm de CO₂, já a mancha parda teve a sua severidade reduzida. Em relação aos mecanismos bioquímicos de defesa contra *B. oryzae*, as plantas quando expostas a 700 ppm de CO₂ apresentaram antecipação, potencialização e prorrogação na atividade de enzimas oxido-redutases (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxidase e polifenoloxidase) e hidrolases (quitinase), e na concentração de compostos fenólicos e lignina, independente do cultivar. Ademais, também foram observadas alterações em características anatômicas (redução na espessura do parênquima e do tamanho das células buliformes), em parâmetros fotossintéticos (aumento da taxa fotossintética, da concentração interna de CO₂ e eficiência do uso da água, e redução na condutância estomática de vapores de água, na taxa transpiratória e na eficiência da carboxilação), na fluorescência da clorofila (redução do fluxo específico de energia dissipada) e no acúmulo de carboidratos (aumento na concentração de açúcares solúveis totais, polissacarídeos e amido). As alterações bioquímicas, morfológicas e acúmulo de carboidratos tiveram relação direta na defesa contra o patógeno em plantas de arroz cultivadas na concentração de 700 ppm de CO₂ atmosférico, que mitigaram o efeito do patógeno nos parâmetros fotossintéticos e da fluorescência da clorofila devido a menor severidade da mancha parda. Os menores valores da severidade da doença foram relacionados a alterações no desenvolvimento das lesões, resultante das respostas de defesa, que foram estimuladas na planta de arroz pelo aumento da concentração de CO₂.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. *Cochliobolus miyabeanus*. Dano celular. Resistência de plantas. Mudanças climáticas.

Abstract

DORNELES, Keilor da Rosa. Increased atmospheric CO₂ concentration affects rice pathosystems, and biochemical and physiological responses against *Bipolaris oryzae*. 2019. 85f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

The increase of atmospheric CO₂ is one of the main environmental variables that can affect the interaction between the plants and their respective pathogens. Based on this, the objective of this study was to investigate the effects of raising the atmospheric CO₂ concentration from 400 ppm to 700 ppm on the severity of blast (*Pyricularia oryzae*), brown spot (*Bipolaris oryzae*), eyespot (*Drechslera gigantea*) and kernel smut (*Tilletia barclayana*) on rice (Chapter I). In regarding to brown spot, caused by *Bipolaris oryzae*, was evaluated in cultivars susceptible (BRS Querência) and resistant (Inov CL), the effects of increasing atmospheric CO₂ concentration on biochemical defense mechanisms (Chapter II), leaf anatomy and in the physiological changes due to the *B. oryzae* infection process in the leaves of rice plants (Chapter III). The results presented in this study demonstrate that the elevation of atmospheric CO₂ concentration causes changes in the epidemiological behavior of rice diseases variable with the type of parasitism of the causal agent. These observations were recorded for the brown spot and eyespot (necrotrophic pathogens), and blast (hemibiotrophic), however, with no expressive effect on the kernel smut (biotrophic). The severity of both eyespot and blast increased in conditions of 700 ppm of CO₂, since the brown spot had its severity reduced. Regarding the biochemical mechanisms of defense against *B. oryzae*, plants exposed to 700 ppm of CO₂ presented an anticipation, potentiation and extension in the activity of oxidoreductase enzymes (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase and polyphenoloxidase) and hydrolases (chitinase), and in the concentration of phenolic compounds and lignin, regardless to the cultivar. In addition, alterations in anatomical characteristics (reduction in parenchyma thickness and size of bulliform cells), in photosynthetic parameters (increase of photosynthetic rate, internal CO₂ concentration and water use efficiency, and reduction in stomatal conductance of water vapor, transpiration rate, and efficiency carboxylation), chlorophyll fluorescence (decrease on specific energy flux) and carbohydrate accumulation (increase in the concentration of total soluble sugars, polysaccharides and starch) were recorded. The biochemical, morphological and changes in carbohydrate concentration were related to defense against the pathogen in rice plants cultivated at 700 ppm of atmospheric CO₂, which mitigated the effect of the pathogen on photosynthetic parameters and chlorophyll fluorescence due to the lower severity of the brown spot. The lower values of the severity of the disease were related to the change in the development of the lesions, as result of the defense responses, which were stimulated in the rice plant by the increase in CO₂ concentration.

Key-words: *Oryza sativa*. *Cochliobolus miyabeanus*. Cellular damage. Resistance of plants. Climate changes.

Lista de Figuras

- Figura 1. Área experimental com estufas de topo aberto (“open-top chambers”, OTC) (A), sensores de monitoramento da concentração da CO₂ (B) e a central de controle e armazenamento dos cilindros de CO₂ (C e D).....23
- Figura 2. Severidade da mancha parda em folhas bandeira de plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, e sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 28
- Figura 3. Severidade da mancha ocular em folhas de plantas de arroz da cultivar BRS Querência cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4. Severidade da brusone em folhas de plantas de arroz da cultivar Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 32
- Figura 5. Representação da parte superior e inferior da planta de arroz, onde foram quantificados a taxa de expansão de lesão (*r*), comprimento final de lesão (CFL) e severidade (Sev) da mancha parda. 43
- Figura 6. Atividade da enzima superóxido dismutases (SOD) (a; b; c e d), catalase (CAT) (e; f; g e h), ascorbato peroxidase (APX) (i; j; k e L), peroxidase (POX) (m; n; o e p), polifenoloxidase (PPO) (q; r; s e t) e quitinase (QUI) (u; v; w e x) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂..... 48
- Figura 7. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo

teste t entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂..... 50

Figura 8. Concentração de derivados lignina-ácido tioglicólico (DLATG) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. 51

Figura 9. Concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. 52

Figura 10. Corte transversal de folha de arroz demonstrado as mensurações da espessura do parênquima, do comprimento e da largura da maior célula buliforme no conjunto de células. 62

Figura 11. Taxa fotossintética (A), condutância estomática de vapores de água (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i), taxa transpiratória (E), eficiência da carboxilação (EC) e a eficiência do uso da água (EUA) aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de t ($p \leq 0,05$). 68

Figura 12. Rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), fluxo específico de energia dissipada (DI_0/RC), fluxo de transporte de elétrons por centro de reação no tempo zero (ET_0/RC) e rendimento quântico de transporte de elétrons (ΦE_0) aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para

cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).
..... 69

Figura 13. Concentração de açúcares totais, sacarose, polissacarídeos e amido as 12, 48 e 96 horas após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$). 71

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (r), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev), da mancha parda em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não, com CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 26
- Tabela 2. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (r), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev) da mancha ocular em plantas da cultivar BRS Querência cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 29
- Tabela 3. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (r), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev), da brusone em plantas da cultivar Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não, com CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 31
- Tabela 4. Incidência e severidade da cárie do arroz em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol..... 33
- Tabela 5. Eficiência relativa de infecção (ERI), número inicial de lesão (NIL) e número final de lesão (NFL) da mancha parda em plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂)..... 46
- Tabela 6. Taxa de expansão da lesão (r), comprimento final da lesão (CFL) e severidade final (Sev) da mancha parda aos 17 dias após a inoculação de *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂). 46
- Tabela 7. Extravasamento de eletrólitos em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂ aos 17 dias após a inoculação com *Bipolaris oryzae*. 53
- Tabela 8. Espessura do parênquima, comprimento e largura da célula buliforme em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂). 66
- Tabela 9. Tamanho de lesão e severidade da mancha parda aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação do *Bipolaris oryzae* em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não com gás carbônico (CO₂). 66

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Capítulo 1.Elevação da concentração do CO ₂ atmosférico afeta o progresso de doenças da cultura do arroz.....	20
2.1	Introdução.....	20
2.2	Material e métodos.....	23
2.2.1	Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz.....	23
2.2.2	Delineamento experimental.....	24
2.2.3	Aplicação do fungicida.....	24
2.2.4	Avaliação dos componentes de resistência.....	24
2.2.5	Análises dos dados.....	25
2.3	Resultados.....	26
2.4	Discussão.....	34
3	Capítulo 2. Respostas bioquímicas do arroz contra <i>Bipolaris oryzae</i> aumentam em elevada concentração atmosférica de CO ₂ . ..	38
3.1	Introdução.....	38
3.2	Material e métodos.....	40
3.2.1	Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz.....	40
3.2.2	Delineamento experimental.....	40
3.2.3	Obtenção do inóculo, procedimento de inoculação e avaliação dos componentes de resistência.....	41
3.2.4	Determinação da atividade das enzimas, concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST), derivados lignina-ácido tioglicólico (DLATG), de aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos (EE)....	43
3.2.5	Análises dos dados.....	45
3.3	Resultados.....	46
3.3.1	Efeito do CO ₂ nos componentes de resistência.....	46
3.3.2	Efeito do CO ₂ nas atividades enzimáticas.....	47
3.3.3	Efeito do CO ₂ na concentração de compostos fenólicos solúveis totais	49
3.3.4	Efeito do CO ₂ na concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (DLATG).....	50
3.3.5	Efeito do CO ₂ na concentração de aldeído malônico.....	52
3.3.6	Efeito do CO ₂ no extravasamento de eletrólitos.....	53
3.4	Discussão.....	54
4	Capítulo 3.Aumento na concentração de CO ₂ atmosférico altera as respostas fisiológicas, bioquímicas e histológicas do arroz contra <i>Bipolaris oryzae</i>	59
4.1	Introdução.....	59

4.2	Material e métodos.....	61
4.2.1	Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz.....	61
4.2.2	Delineamento experimental	61
4.2.3	Características anatômicas da lâmina foliar do arroz	62
4.2.4	Inoculação do patógeno e avaliação dos componentes de resistência .	63
4.2.5	Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	63
4.2.6	Extração e quantificação de carboidratos em folhas de arroz	64
4.2.7	Análises dos dados.....	65
4.3	Resultados	65
4.3.1	Características anatômicas da lâmina foliar do arroz	65
4.3.2	Componentes de resistência	66
4.3.3	Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila	67
4.3.4	Açúcares.....	70
4.4	Discussão	71
5	Conclusões gerais.....	76
6	Referências	77

1 Introdução

O homem não tem medido esforços na busca para compreender e estudar a problemática das mudanças climáticas, que vem se tornando cada vez mais evidenciada no decorrer das últimas décadas. Órgãos de pesquisa indicam que o uso intensivo dos recursos naturais - como a queima de combustíveis fósseis, desmatamentos, atividades agrícolas e desenvolvimento urbano - é uma das principais causas responsáveis pelo aceleração desse fenômeno (IPCC, 2014).

As mudanças climáticas se manifestam de diversas formas, dentre elas se destaca o aquecimento global, termo usado para identificar o aumento da temperatura do planeta (DELCOUR et al., 2015). Ademais, a frequência e intensidade de ocorrência dos eventos climáticos extremos e alterações no regime de chuvas estão sendo observadas, bem como perturbações nas correntes marítimas, retração de geleiras e elevação do nível dos oceanos (LETCHER, 2009). Diante dessa ampla gama de eventos, houve a criação do termo “mudança ambiental global” no qual envolve também o aumento da concentração de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico, de ozônio (O_3) na troposfera e outros impactos (IPCC, 2014).

O dióxido de carbono (CO_2) é um dos gases de maior relevância do efeito estufa (relacionada ao aumento da temperatura) e tem apresentado um aumento acelerado na sua concentração atmosférica nos últimos anos (no período de 1995 a 2005 de 280 ppm para 379 ppm), ultrapassando faixas naturais de aumento (IPCC, 2014). Além disso, estima-se que se a tendência persistir no ano 2100, a concentração atmosférica de CO_2 estará em torno de 750 a 1020 ppm (IPCC, 2013). Tais alterações no clima desencadeiam alterações em todos os setores econômicos, especialmente na agricultura, que apresenta grande influência do mesmo.

Para as plantas, do ponto de vista fisiológico, geralmente a elevação da concentração de CO_2 atmosférico promove benefícios devido alterações no metabolismo e crescimento. A intensidade das alterações em resposta as variações na concentração de CO_2 atmosférico varia entre as espécies vegetais e os tipos de metabolismo do carbono das mesmas (CHAKRABORTY et al., 2008; XU; JIANG; ZHOU, 2015). No entanto, uma questão fundamental que merece ser destacada é que as alterações morfofisiológicas na planta

podem modificar a intensidade de algumas das suas doenças por interferir nas relações patógeno-hospedeiro (CHAKRABORTY et al., 2008). Tais alterações podem resultar na redução da durabilidade da resistência efetiva das plantas devido ao desenvolvimento acelerado das populações dos patógenos ou redução das defesas da planta contra o mesmo (GHINI, 2005; WILLIAMS et al., 2018).

Estudos vêm sendo desenvolvidos em situações de atmosfera controlada na busca de respostas, porém ainda é incipiente e inconclusivo o conhecimento sobre o efeito das mudanças climáticas, em especial a concentração atmosférica de CO₂, na severidade das doenças de plantas (CHAKRABORTY; MURRAY; WHITE, 2002; GHINI, 2005; ABDELGAWAD et al., 2016).

Chakraborty et al. (2002) ao estudar o efeito da concentração elevada de CO₂ na produção e dispersão de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Stylosanthes scabra* verificou redução da severidade da antracnose em ambiente enriquecido com 700 ppm de CO₂ quando comparado ao ambiente com 350 ppm. Plantas de tomate submetidas ao CO₂ atmosférico de 700 ppm apresentaram aumento na resistência à infecção por *Phytophthora parasítica* (JWA; WALLING, 2001). Em cevada, a penetração por *Erysiphe graminis* em folhas e a severidade do oídio foram reduzidos em concentração de 700 ppm de CO₂ atmosférico (HIBBERD et al., 1996). Em batata, a severidade da requeima, causada por *Phytophthora infestans*, foi reduzida com aumento do CO₂ de 400 ppm para 700 ppm (PLESSL et al., 2007). Por outro lado, incremento na severidade do oídio (*Microsphaera diffusa*) em plantas de soja ocorreu quando cultivadas em ambiente com 504 ppm de CO₂ (LESSIN; GHINI, 2009).

Revisando estudos sobre o aumento de CO₂ Chakraborty et al. (2008), constataram que em 26 patossistemas avaliados, houve aumento na severidade em treze, redução em nove e sem efeito para quatro doenças. Luck et al. (2011) em uma ampla revisão sobre os efeitos de altas concentrações de CO₂ na atmosfera sobre patógenos, constatou que não é possível generalizar os efeitos das alterações climáticas para todos os patossistemas existentes. Cada um dos patossistemas necessita ser estudado

individualmente, para assim seja possível verificar prováveis alterações na intensidade da doença.

O arroz (*Oryza spp*), cultivado e consumido em todos os continentes, é um dos cereais indispensáveis para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas (SOSBAI, 2016). Esse cereal obteve rápidos aumentos na produtividade ao longo da segunda metade do século 20, porém atualmente esses aumentos vêm se tornando cada vez mais difíceis de serem mantidos e impulsionados (KARKI, et al., 2013). Por outro lado, por ser intitulado pelos órgãos governamentais como alimento básico para suprir a demanda populacional futura, a cultura do arroz se destaca no cenário atual, como uma linha de pesquisa, a qual visam o incremento de sua produtividade (SHEEHY; MITCHELL, 2011; KARKI, et al., 2013).

Entretanto, alguns fatores abióticos e/ou bióticos ainda são limitantes para a obtenção do potencial máximo de rendimento da cultura. Dentre os bióticos estão às doenças causadas por diversos fitopatógenos incluindo fungos, vírus, bactérias e nematoides (SOSBAI, 2016).

As doenças, consideradas como mais relevantes pelos danos no rendimento da cultura nas diversas regiões orizícolas distribuídas pelo mundo, são as causadas por patógenos fúngicos como a *Pyricularia oryzae* Cav. (agente causal da brusone) e *Bipolaris oryzae* Breda de Haan (agente causal da mancha-parda). Há, também as, doenças consideradas secundárias ou de ocorrência localizada, como a *Drechslera gigantea* Heald & F.A. Wolf (agente causal da mancha ocular) e a *Tilletia barclayana* Bref. (agente causal da cárie ou carvão preto do grão) (SUNDER et al., 2014; SOSBAI, 2016).

Essas enfermidades de maneira geral, podem se desenvolver em todas as fases do ciclo da cultura, porém suas ocorrências são mais comuns após a floração causando danos na produtividade e qualidade dos grãos (DALLAGNOL et al., 2011; SUNDER et al., 2014). Sobretudo, os patógenos supramencionados apresentam formas de parasitismo diferentes como: necrotróficos (*B. oryzae* e *D. gigantea*), hemibiotrófico (*P. oryzae*) e biotrófico (*T. barclayana*). Os diferentes tipos de parasitismo podem ser influenciados, aumentando ou diminuindo a intensidade da doença, em função do estado nutricional da planta, especialmente as formas de carboidratos acumulados

(MORKUNAS; RATAJCZAK, 2014) os quais podem ser alterados pelas variações climáticas (EASTBURN; MCELTRONE; BILGIN, 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, os requerimentos ambientais para epidemias variam de acordo com o patógeno. No caso da mancha parda, a infecção do fungo *B. oryzae* ocorre em amplitude térmica de 16 a 36°C, mas ótima a 25°C (SHERF et al., 1947; PERCICH et al., 1997). Elementos climáticos como chuvas intensas, alta umidade relativa, períodos prolongados de nebulosidade e temperaturas amenas durante os estádios de florescimento e enchimento de grãos tem sido correlacionado com as epidemias da mancha parda (SUNDER et al., 2014). Períodos de molhamento prolongados tendem a aumentar o número de lesões da mancha parda por unidade de área foliar (PERCICH et al., 1997). Para a brusone, a infecção do fungo *P. oryzae* é favorecida por temperaturas moderadas de 25 a 28°C e períodos de alta umidade de duração superior a 12 horas (SOSBAI, 2016). O período de latência e a duração do período infeccioso também são influenciados pela temperatura, precipitação pluviométrica, umidade e vento (KARAMIAN et al., 2015). Em relação a mancha ocular, mesmo que as informações ainda sejam limitadas, devido ao seu recente relato (NUNES, 2008). Estudos indicam que a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno na área é entre 26 à 28°C, com clima chuvoso e quanto maior o período de orvalho, maior será a severidade da doença (GULART et al., 2015). Para a cárie do arroz, a infecção do fungo *T. barclayana* é favorecida por condições de chuvas frequentes, alta luminosidade e umidade relativa do ar superior a 85% e temperatura de 25 a 30°C no período de antese das plantas de arroz (ZEMOLIN et al., 2009).

Assim, evidencia-se que a incidência e a severidade das doenças supramencionadas são dependentes de um ambiente favorável. Contudo, além das variáveis conhecidas a séculos como relevantes para epidemias, molhamento, temperatura e luminosidade, a concentração atmosférica CO₂ também possui a sua parcela de influência, especialmente com as futuras concentrações previstas. O seu efeito pode se dar por meio da alteração da temperatura global (associado ao efeito estufa) o que pode alterar o regime hídrico regional, modificando o período e intensidade de chuvas. Associado a essas modificações, também se deve considerar que o CO₂ é um composto

chave no metabolismo de plantas, podendo assim alterar, os padrões das interações complexas entre plantas-microbiota, desde o mutualismo até parasitismo (LUCK, J. et al., 2011; NOCTOR; MHAMDI, 2017).

Assim, os estudos aqui descritos relatam os efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico em plantas de arroz no progresso das doenças brusone, mancha parda, mancha ocular e da cárie do arroz. Não obstante, elucidam, pelo menos em parte, a forma que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico influenciou a severidade da mancha parda, por meio da análise de mecanismos bioquímicos de defesa e também, aspectos fisiológicos e anatômicos da planta. Os estudos aqui reportados revelam novas informações que podem ser utilizadas por pesquisadores e melhoristas como base para novas pesquisas. Além disso, o estudo fornece indícios, a todos os elos que integram a corrente da agricultura, sobre o comportamento do patossistema *B. oryzae* - arroz em condições climáticas futuras.

2 Capítulo 1. Elevação da concentração do CO₂ atmosférico afeta o progresso de doenças da cultura do arroz.

2.1 Introdução

O arroz (*Oryza spp*) é o segundo cereal mais consumido no mundo (CONAB, 2018). O maior mercado consumidor é o continente asiático o qual também corresponde aproximadamente 90% da área de cultivo e da produção (SOSBAI, 2016). Já na América do Sul, o Brasil se destaca como maior produtor, e a região Sul do país como a principal zona orizícola. Nessa região brasileira foram obtidos ganhos substanciais na produtividade na última década, obtendo média de 7,729 kg ha⁻¹ na safra 2017/18 (CONAB, 2018). Entretanto, a produtividade ainda está muito abaixo do potencial produtivo das cultivares de arroz, que, podem chegar até 14,000 kg ha⁻¹ (SOSBAI, 2016). Dentre os fatores limitantes para produtividades próximas ao potencial genético, destacam-se as doenças bióticas, que podem ocorrer em todas as fases de desenvolvimento da cultura causando danos na produção (BORDIN et al., 2016). Os danos, causados por patógenos no arroz, incluem a redução do estande de plantas, do tecido fotossintético, no menor número e/ou tamanho de grão e sua qualidade industrial (BORDIN et al., 2016), bem como a qualidade sanitária e fisiológica das sementes (SUNDER et al., 2014).

Entre os patógenos que acometem a cultura do arroz irrigado, o fungo *Pyricularia oryzae* Cav., agente causal da brusone, é o mais destrutivo, comprometendo em até 100% o rendimento de grãos em anos epidêmicos (SOSBAI, 2016). Danos significativos no rendimento, de até 40%, também têm sido relacionados à ocorrência de *Bipolaris oryzae* Breda de Haan, agente causal da mancha-parda (SUNDER et al., 2014). Não obstante, doenças consideradas secundárias ou de ocorrência localizada, como a mancha ocular (*Drechslera gigantea* Heald & F.A. Wolf) e da cárie ou carvão preto do grão (*Tilletia barclayana* Bref.) têm causado reduções no rendimento e ou qualidade de grãos em até 40%, dependendo do ano e da cultivar (ZEMOLIN et al., 2009).

Atualmente, o controle das doenças está fundamentado na semeadura de cultivares com resistência, completa ou parcial, adoção de práticas culturais e uso de fungicidas. As práticas culturais mais utilizadas incluem uso de uma adubação mineral equilibrada, semeadura em época recomendada, rotação de cultura e a utilização de sementes certificadas (SOSBAI, 2016). O uso de cultivares resistente está entre os meios mais eficazes e econômicos de reduzir os danos causados por patógenos, sem causar problemas ambientais. Porém, cultivares com elevado nível de resistência a vários patógenos não estão disponíveis (SOARES et al., 2003; SOSBAI, 2016). Assim, o controle químico, com fungicidas aplicados tanto via tratamento de sementes quanto pulverização foliar, é uma alternativa eficiente, economicamente viável e capaz de garantir maior produtividade e qualidade de grãos (BORDIN et al., 2016).

No entanto, variações de elementos climáticos podem tornar as práticas atualmente empregadas no manejo das doenças insatisfatórias, especialmente as que afetam a taxa de progresso da doença, já que as mesmas estão estritamente relacionadas com aspectos fisiológicos e metabólicos da planta.

Entre as variações climáticas, o dióxido de carbono (CO_2) se tornou uma problemática a ser estudada pela comunidade científica, devido ao seu constante aumento na concentração atmosférica, nos últimos dois séculos (ABDELGAWAD et al., 2016).

Para o arroz, estudos desenvolvidos indicam que o incremento na disponibilidade de CO_2 confere alterações no seu metabolismo primário e secundário (NOCTOR; MHAMDI, 2017; WILLIAMS et al., 2018). Assim, as alterações metabólicas na planta, causadas pelo aumento da concentração de CO_2 atmosférico, pode modificar a interação planta-patógeno. Entre os patógenos que acometem o arroz há aqueles que têm relação parasitária do tipo biotrófico, hemibiotrófico e necrotrófico que apresentam estratégias de ataque variadas e demandas nutricionais diferentes. Patógenos biotróficos são aqueles que se alimentam da planta parasitada, mantendo a célula infectada viva, na qual o patógeno completa seu ciclo de vida; os necrotróficos são aqueles que matam as células concomitantemente com a infecção e extraem nutrientes de tecidos vegetais mortos; os hemibiotróficos apresentam o início da sua relação parasitária como os biotróficos, porém após estabelecidos na

célula vegetal induzem a morte do tecido semelhantemente ao observado para os necrotróficos (CHOWDHURY; BASU; KUNDU, 2017). Assim, a concentração, acúmulo e disponibilidade de nutrientes no tecido vegetal, como a concentração de carboidratos, pode alterar a dinâmica da patogênese de forma positiva ou negativa conforme o tipo de parasitismo (MORKUNAS; RATAJCZAK, 2014).

Vale também ressaltar, que a eficácia do controle químico pode ser afetada pelo aumento do CO₂, devido alterar o seu comportamento na planta. Essa alteração se dá pelo aumento na taxa de crescimento vegetal causado pela maior disponibilidade de CO₂, resultando na diluição da concentração do fungicida absorvido pela planta (GHINI, 2005; DELCOUR et al., 2015). Também, não pode ser descartada a alteração na taxa de metabolização do ingrediente ativo, afetando o seu residual no tecido vegetal (GHINI, 2005).

No que tange a ocorrência de doenças em condições de elevada concentração de CO₂, as informações disponíveis ainda são muito incipientes. Alguns estudos realizados por meio da inoculação de plantas indicam que o incremento (até 650 ppm) na disponibilidade de CO₂ confere aumento na porcentagem de plantas infectadas por *Rhizoctonia oryzae* e *P. oryzae* KOBAYASHI et al., (2006). Outro estudo realizado com diferentes cultivares de arroz inoculadas com *P. oryzae* também indicou maior severidade da doença em condições de aumento de CO₂ (GÓRIA et al., 2013). Entretanto, desconhecesse como ocorrerá o desenvolvimento de doenças, causadas por patógenos com diferentes tipos de relação parasitária, quando o inóculo inicial é de ocorrência natural.

Nesse contexto, o objetivo com este estudo é agregar informações sobre os efeitos da elevação da concentração do CO₂ atmosférico, sobre diferentes patossistemas da cultura, por ocorrência natural do patógeno sob duas cultivares de arroz.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz

As cultivares de arroz BRS Querência (Embrapa) e Inov CL (Ricetec) foram utilizadas nos experimentos. A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade 2 litros, contendo aproximadamente 1,5 kg de solo peneirado. Ao solo foi adicionado fertilizante químico, composto por 5% de nitrogênio, 20% de fósforo e 20% de potássio, conforme as indicações técnicas para a cultura do arroz irrigado (SOSBAI, 2016). Logo após a semeadura, os vasos foram alocados em estufas de topo aberto (“open-top chambers”, OTC).

As OTCs tinham formato quadrangular e estrutura de madeira (4 m² e 2 m de altura) com as laterais protegidas por um filme plástico transparente de polietileno, equipadas com um redutor de abertura do topo para deflexionar o ar e, assim, prevenir a diluição da concentração desejada de CO₂ dentro da estufa (Fig. 1a). A transferência do CO₂ puro contido no cilindro para os OTCs, ocorreu através de uma tubulação até atingir o controlador de fluxo, que faz a regulação a quantidade de CO₂ distribuído em cada OTC (Figura 1a-d).



Figura 1. Área experimental com estufas de topo aberto (“open-top chambers”, OTC) (A), sensores de monitoramento da concentração da CO₂ (B) e a central de controle e armazenamento dos cilindros de CO₂ (C e D).

As concentrações utilizadas foram 400 ppm CO₂ [considerada como atual no ambiente (teste controle)] e 700 ppm CO₂ [concentração prevista para no ano de 2050 (IPCC, 2014)]. As OTCs estão situadas na área experimental do campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas, localizada na cidade de Capão do Leão/RS (latitude 31° 48' 03. 5"S, longitude 52° 24' 42.2"W. Gr.).

2.2.2 *Delineamento experimental*

Os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Na quantificação dos componentes de resistência da mancha parda e da cárie do arroz foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 × 2, cujos fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL), duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂) e plantas submetidas ou não a aplicação de fungicida. Para os componentes de resistência da mancha ocular e brusone, foram considerados o esquema fatorial 2 × 2 cujos fatores consistiram em duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂) e plantas com e sem aplicação do fungicida.

2.2.3 *Aplicação do fungicida*

Cinquenta (50) dias após a semeadura no estágio fenológico V₉-V₁₀ (segundo escala de COUNCE, 2000), foi aplicado fungicida trifloxistrobina (100 g. L) + tebuconazol (200 g. L) na dose de 0,75 L ha⁻¹. A aplicação foi realizada pelo período da manhã com temperatura 27°C, utilizando um pulverizador costal pressurizado por CO₂, equipado com barra com 4 pontas contendo pontas de jato plano em leque, série 110.02, espaçadas em 50 cm, calibrado para aplicar volume de calda de 200 L ha⁻¹.

2.2.4 *Avaliação dos componentes de resistência*

Mancha parda, brusone, mancha ocular e cárie do arroz

A ocorrência das doenças foi devido ao inóculo presente no ambiente, não sendo realizada inoculação das plantas. A mancha ocular foi avaliada na cultivar BRS Querência, devido a Inov CL apresentar resistência completa a *D. gigantea*. A brusone foi avaliada apenas na cultivar Inov CL, pois a BRS Querência, mesmo sendo considerada suscetível a *M. oryzae*, não apresentou

a doença. A mancha parda e cárie do arroz foram avaliadas em ambas as cultivares em outro conjunto de plantas.

Setenta e oito (78) dias após a semeadura no estágio fenológico V₉-V₁₀ (segundo escala de COUNCE, 2000), iniciaram-se as avaliações dos componentes de resistência, conforme metodologia descrita por Dorneles et al. (2017), na terceira, quarta e quinta folhas do colmo principal. Os componentes de resistência avaliados foram: taxa de expansão da lesão (r), comprimento final da lesão (CFL), número final de lesões por cm² (NFL) e a severidade final (SF) aos 114 dias após a semeadura. A r indica a velocidade, em função do tempo, da colonização dos tecidos da planta pelo patógeno. A r foi obtida por meio da regressão linear das mensurações de cinco lesões em uma folha por planta, de cada repetição, a cada 24 h após o início das avaliações. O CFL (mm) foi medido aos 114 dias após a semeadura (Das) em cinco lesões, selecionadas aleatoriamente, na região central de duas folhas de uma planta por repetição, utilizando-se um paquímetro eletrônico digital. A SF em porcentagem (%), da mancha parda, mancha ocular e brusone foram estimadas através do software para quantificação de doenças de plantas QUANT® (UFV, Brasil).

A avaliação da cárie do arroz foi realizada em plantas no estágio de maturação fisiológica, por meio da quantificação da incidência e severidade da doença. A incidência de *T. barclayana* foi determinada por meio da contagem do número de panículas por planta que apresentavam os sintomas da doença. A severidade da doença foi estimada em 10 panículas por repetição de cada tratamento pela contagem do número de grãos cariados (identificados, pela presença de massa negra de esporos) em relação ao total de grãos por panícula.

2.2.5 Análises dos dados

Para evidenciar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de *Shapiro Wilk*, para todas as variáveis realizadas nos experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Student (teste- t) no software SAS (SAS Institute, 1989, Cary, NC).

2.3 Resultados

Mancha parda

O *B. oryzae* foi afetado negativamente pela elevação da concentração do CO₂ atmosférico conforme indicado pelos componentes de resistência (Tabela 1).

A *r*, CFL e Sev nas plantas da cv. BRS Querência, sem fungicida e a 400 ppm de CO₂ atmosférico, foi maior em 30, 13 e 41%, respectivamente, quando comparado a cv. Inov CL (Tabela 1). Com aplicação do fungicida, a 400 ppm de CO₂, plantas da cv. BRS Querência apresentaram o NFL, *r* e Sev, respectivamente, 140, 28 e 27% maior quando comparado a cv. Inov CL. Já a 700 ppm de CO₂, a Sev foi 31,64% menor para cv. Inov CL, quando comparado a cv. BRS Querência.

Tabela 1. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (*r*), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev), da mancha parda em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não, com CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

Cultivar	NFL (cm ²)				<i>r</i>			
	400 ppm		700 ppm		400 ppm		700 ppm	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
BRS Querência	9,66a A	8,70a B	4,83a A	4,56a A*	0,13a A	0,09b B	0,09a A*	0,08a A
Inov CL	6,37a A	3,62b B	8,06a A	5,50a A	0,10b A	0,07a B	0,09a A*	0,06a B*
CV%	15,0				20,0			

Cultivar	CFL (mm)				Sev (%)			
	400 ppm		700 ppm		400 ppm		700 ppm	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
BRS Querência	4,81a A	3,85a B	3,88a A*	4,02a A	34,25a A	20,62a B	22,25a A*	19,75a B
Inov CL	4,23b A	4,07a B	3,95a A	3,51a A*	24,25b A	16,25b B	17,75a A*	13,50b A*
CV%	22,0				24,0			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste - t ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. Letras maiúsculas na linha, compara as médias da aplicação ou não do fungicida trifloxistrobina + tebuconazol, dentro de cada concentração de CO₂ pelo teste - t ($p \leq 0,05$). * refere-se a diferença significativa, pelo teste - t ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento, entre as concentrações de CO₂.

Quando comparado com o efeito do fungicida, nas plantas a 400 ppm de CO₂, que receberam a aplicação do fungicida, apresentaram o NFL, *r*, CFL e a Sev, menor em 10, 30, 20 e 40%, respectivamente, para cv. BRS Querência, enquanto, para cv. Inov CL a redução foi de 43, 30, 4 e 33% quando comparado a plantas sem fungicida. Nas plantas a 700 ppm de CO₂, a aplicação do fungicida, reduziu a *r* e a Sev em 33 e 24% para cv. Inov CL (Tabela 1).

Quando comparado o efeito da concentração de CO₂, plantas à 700 ppm de CO₂ e sem fungicida, apresentaram decréscimo na *r*, CFL e Sev em 30, 19 e 35% na cv. BRS Querência, enquanto que para cv. Inov CL a redução foi de 10 e 27% respectivamente para a *r* e a Sev, quando comparado a plantas cultivadas a 400 ppm de CO₂ e sem fungicida. Plantas com fungicida, à 700 ppm de CO₂, da cv. BRS Querência apresentaram redução de 47% no NFL, e da cv. Inov CL a redução foi de 14, 13, e 17% respectivamente para *r*, CFL e Sev, quando comparado a plantas cultivadas a 400 ppm de CO₂ (Tabela 1).

Na figura 2a e 2b está demonstrada a diferença na severidade, número e tamanho de lesões da mancha parda nas folhas das duas cultivares de arroz, que receberam ou não aplicação de fungicida, cultivada a 400 ppm e em 700 ppm de CO₂.

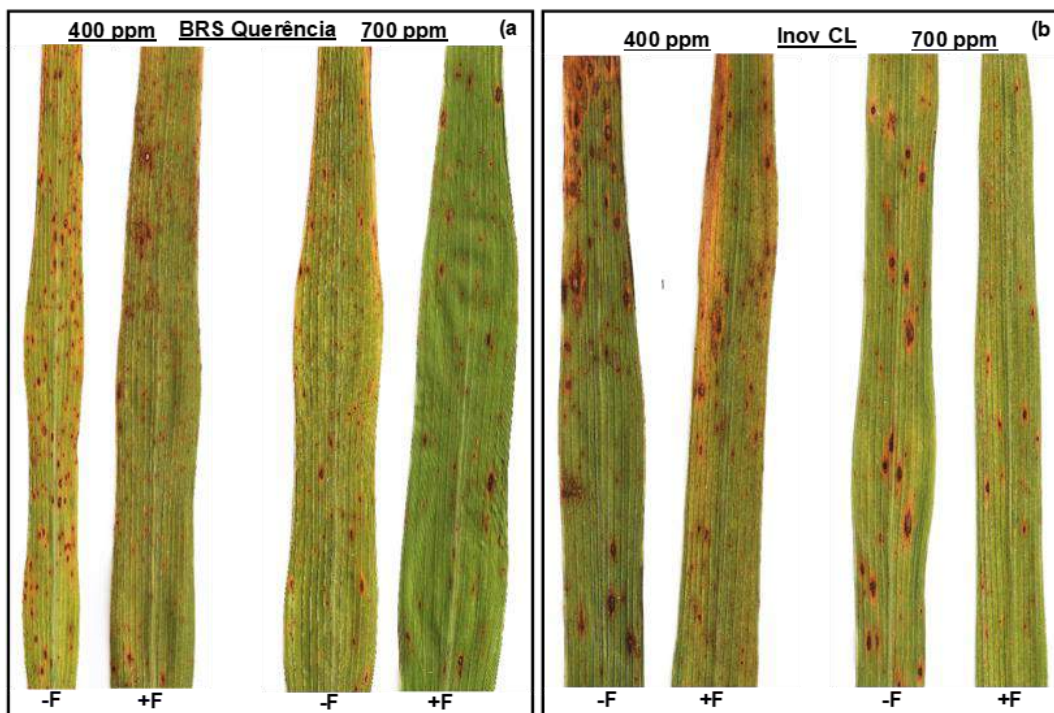


Figura 2. Severidade da mancha parda em folhas bandeira de plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, e sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

Nas folhas das plantas da cv. BRS Querência a 400 ppm de CO₂, sem fungicida, observa-se grande número de lesões por unidade de área foliar. As lesões, de formato ovalado, apresentam desenvolvimento característico da mancha parda, apresentando o centro necrosado e um halo com intensa clorose. Já, para as plantas tratadas com fungicida, observa-se menor número de lesões com desenvolvimento característico da doença, predominando lesões pequenas e escuras com pequeno halo clorótico nas bordas (Figura 2a). Nas folhas das plantas a 700 ppm é observado menor número de lesões as quais também foram menores, comparado as plantas a 400 ppm, independente da aplicação do fungicida. Verifica-se nas plantas tratadas com fungicida que poucas lesões se desenvolveram e formaram halo clorótico (Figura 2a). Para a cv. Inov CL sem fungicida, a 400 ppm, há presença de lesões grandes, porém em menor número, quando comparado a cv. BRS Querência sem fungicida,

além do halo clorótico mais atenuado (Figura 2b). Já para as plantas com fungicida, além do número de lesões menor que as plantas sem fungicida, as lesões tiveram seu desenvolvimento mais restrito, formando pequenos pontos escuros com halo clorótico restrito (Figura 2b). A 700 ppm, verifica-se redução no tamanho e no número de lesões por unidade de área, especialmente nas plantas tratadas com fungicida.

Mancha ocular

A mancha ocular foi favorecida pela elevação da concentração de CO₂ atmosférico. As plantas de arroz sem fungicida à 700 ppm de CO₂ apresentaram acréscimo de 300, 27 e 44%, respectivamente, para o *r*, CFL e Sev, quando comparado a plantas cultivadas a 400 ppm (Tabela 2). Para plantas de arroz com fungicida à 700 ppm de CO₂, o *r* e o CFL aumentaram, respectivamente em 200 e 47% quando comparado a plantas cultivadas à 400 ppm de CO₂ (Tabela 2).

Tabela 2. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (*r*), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev) da mancha ocular em plantas da cultivar BRS Querência cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

Concentrações (ppm)	NFL (cm ²)		<i>r</i>		CFL (mm)		Sev (%)	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
400	12,12a A	12,12a A	0,01b A	0,01b A	4,09b A	3,16b B	26,50b A	18,0a B
700	5,46b A	5,46b A	0,04a A	0,03a A	5,18a A	4,64a A	38,25a A	19,0a B
CV%	10,0		12,0		8,0		15,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste - t ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de CO₂. Letras maiúsculas na linha, compara as médias da aplicação ou não do fungicida pelo teste - t ($p \leq 0,05$).

A aplicação do fungicida nas plantas de arroz a 400 ppm reduziu o CFL e Sev em 23 e 32%, respectivamente. Nas plantas cultivadas a 700 ppm a redução na Sev pela aplicação do fungicida foi de 50% (Tabela 2).

Na figura 3 está demonstrada a variação na severidade, número e tamanho de lesões da mancha ocular nas folhas da cv. BRS Querência cultivada a 400 ppm ou 700 ppm de CO₂, sem e com aplicação foliar de fungicida.

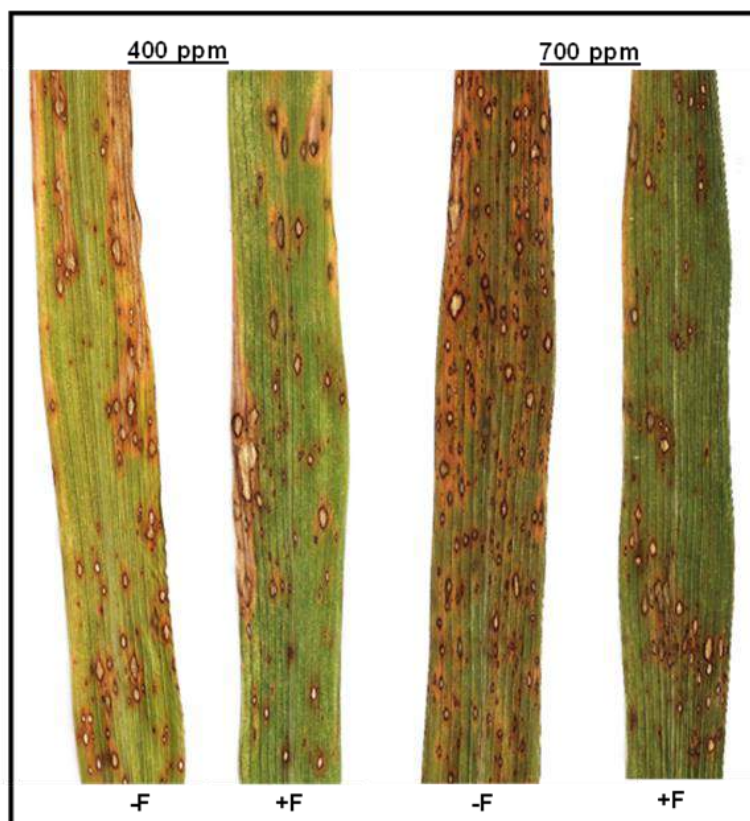


Figura 3. Severidade da mancha ocular em folhas de plantas de arroz da cultivar BRS Querência cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

A 400 ppm, nas folhas da cv. BRS Querência sem fungicida, as lesões são ovais ou circulares de cor marrom ou pardas com centro acinzentado e contorno marrom avermelhado, ocorrendo a coalescência de várias lesões originando grande extensão de tecido afetado. Já para as plantas tratadas com fungicida, as lesões foram menores, em menor número e raramente apresentaram coalescência (Figura 3). A 700 ppm, nas folhas das plantas sem fungicida foi observado maior número de lesões por unidade de área foliar, as quais se expandiram, apresentando o centro acinzentado e com halo bem intenso, levando a formação de zonas cloróticas na folha devido a frequente coalescência de lesões. Já para as plantas tratadas com fungicida, também foram observadas lesões nas folhas, porém em menor número e estas apresentaram pouco desenvolvimento e o halo restrito a suas bordas (Figura 3).

Brusone

A elevação da concentração de CO₂ atmosférico favoreceu o desenvolvimento da brusone. O fator CO₂ foi significativo para quase todas as variáveis, independente da aplicação do fungicida (Tabela 3).

Tabela 3. Número final de lesões (NFL), taxa de expansão da lesão (*r*), comprimento final da lesão (CFL) e a severidade (Sev), da brusone em plantas da cultivar Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não, com CO₂, sem (-F) e com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

Concentrações (ppm)	NFL (cm ²)		<i>r</i>		CFL (mm)		Sev (%)	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
400	2,33a A	1,52b A	0,05a A	0,05b A	5,61b A	5,18b A	19,0b A	17,52a A
700	2,81a A	2,18a A	0,08a A	0,09a A	7,85a A	7,10a A	24,0a A	19,51a A
CV%	8,0		18,0		25,0		20,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste - t ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de CO₂. Letras maiúsculas na linha, compara as médias da aplicação ou não do fungicida pelo teste - t ($p \leq 0,05$).

Na ausência do tratamento com fungicida, plantas de arroz a 700 ppm de CO₂ apresentaram aumento de 40 e 26%, respectivamente, no CFL e na Sev da brusone, quando comparadas as plantas cultivadas a 400 ppm (Tabela 3). Na presença do tratamento com fungicida, nas plantas de arroz a 700 ppm de CO₂, o *r* e o CFL aumentaram, respectivamente, em 80 e 37% quando comparado a plantas cultivadas à 400 ppm de CO₂ (Tabela 3). O fator fungicida não foi significativo para o *r*, CFL e a severidade (Tabela 3).

A figura 4 demonstra a variação na severidade, número e tamanho de lesões da brusone na cv. BRS Querência cultivada a 400 ppm ou 700 ppm de CO₂, sem e com aplicação foliar de fungicida.

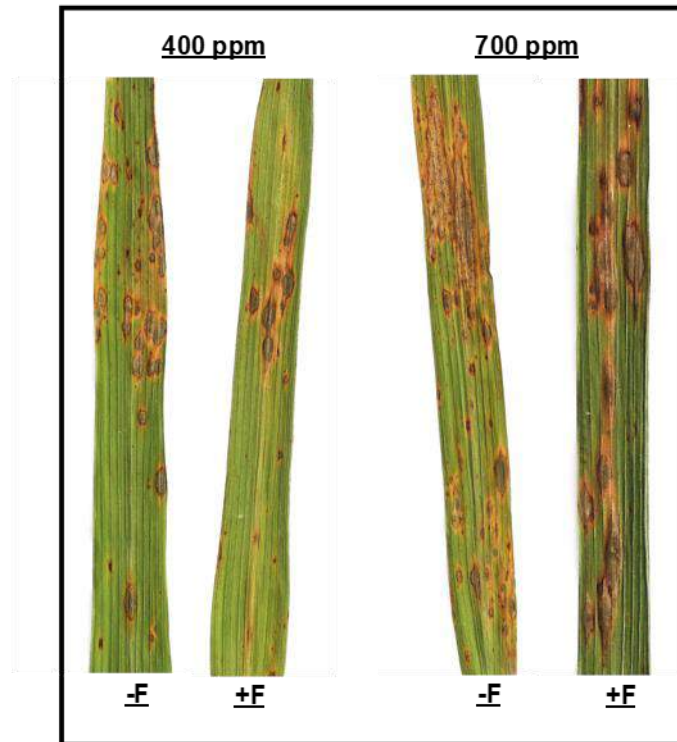


Figura 4. Severidade da brusone em folhas de plantas de arroz da cultivar Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

A 400 ppm, nas folhas da cv. Inov CL sem fungicida, foi observado lesões de formato losangular a ovalado, com o centro cinza e bordas marrom-avermelhada, circundadas por um halo amarelado. Já para as plantas tratadas com fungicida, também foram observadas lesões nas folhas, porém estas foram em menor número por unidade de área foliar (Figura 4). A 700 ppm, nas folhas das plantas sem fungicida foi observado maior número de lesões, de formato elíptico e com extremidades agudas e halo clorótico bem intenso, que se expandiram no sentido das nervuras gerando pontos coalescência. Já para as plantas tratadas com fungicida, também foram observadas lesões de formato elíptico e com extremidades agudas, que se expandiram no sentido das nervuras, porém o número de pontos coalescência foram menores (Figura 4).

Cárie do arroz

Plantas da cv. Inov CL, com fungicida, à 400 ppm de CO₂, apresentaram menor incidência e severidade da cárie, respectivamente em 39 e 58% quando comparadas com a cv. BRS Querência (Tabela 4). Não ocorreu diferença entre as cultivares na ausência de fungicida (Tabela 4). Enquanto, à 700 ppm de CO₂, a severidade foi 65% menor, em plantas com fungicida, da cv. Inov CL, quando comparado a cv. BRS Querência (Tabela 4).

Tabela 4. Incidência e severidade da cárie do arroz em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂, sem (-F) ou com (+F) aplicação de fungicida trifloxistrobina + tebuconazol.

Cultivares	Incidência (%)				Severidade (%)			
	400 ppm		700 ppm		400 ppm		700 ppm	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
BRS Querência	58,31a A	67,91a A	53,37a A	69,48a A	9,73a A	17,45a A	12,41a A	17,32a A
Inov CL	46,17a A	41,33b A	63,39a A*	54,37a A	10,8a A	7,36b A	6,26a A	6,03b A
CV%	38,0				28,0			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste - t ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. Letras maiúsculas na linha, compara as médias da aplicação ou não do fungicida trifloxistrobina + tebuconazol, dentro de cada concentração de CO₂ pelo teste - t ($p \leq 0,05$). * refere-se a diferença significativa, pelo teste - t ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento, entre as concentrações de CO₂.

Quando comparado o efeito do fungicida, não ocorreu diferença significativa para as variáveis avaliadas, para ambas as cultivares, independente da concentração de CO₂ (Tabela 4).

Quando comparado o efeito do CO₂, plantas sem fungicida, à 700 ppm de CO₂, apresentaram maior incidência da cárie em 37% na cv. Inov CL (Tabela 4) quando contraposto a plantas cultivadas à 400 ppm de CO₂.

2.4 Discussão

Os resultados apresentados nesse estudo demonstram que a elevação da concentração de CO₂ atmosférica causa alterações no comportamento epidemiológico de doenças do arroz variável com a forma de parasitismo do patógeno. Estas observações foram registradas para a mancha parda e mancha ocular, ambas causadas por patógenos necrotróficos, e a brusone, causada por patógeno hemibiotrófico, todavia, sem efeito expressivo sobre a cárie do arroz, causada por patógeno biotrófico.

A compreensão desse acontecimento é elucidada ao se observar a resposta dos componentes de resistência para cada patossistema. Esses componentes são compostos por variáveis, que, quando sumarizadas, representam a capacidade da planta em retardar ou inibir a infecção, a colonização e a reprodução do patógeno, no seu tecido (DALLAGNOL et al., 2009).

Dessa forma, a elevação da concentração de CO₂ de 400 ppm para 700 ppm afetou, de acordo com cada patossistema, a taxa de expansão da lesão (r), que influencia diretamente no comprimento final da lesão (CFL), e o número final de lesões (NFL) por área foliar, que também é influenciado pela capacidade de penetração do patógeno nas células da epiderme (DORNELES et al., 2017), a qual é principal via de infecção de fungos causadores de doenças foliares (MENGISTE, 2012). O somatório do comportamento dessas variáveis resultará no valor da severidade da doença (DORNELES et al., 2017).

Assim, tomados em conjunto, os dados desse estudo mostram que nas plantas de arroz quando cultivadas em condições de CO₂ elevado, ocorre atenuação da severidade da mancha parda, enquanto que para a severidade da mancha ocular e da brusone é intensificada

Até o momento, ainda não haviam sido realizadas pesquisas sobre aumento da concentração do CO₂ atmosférico para os patógenos como *B. oryzae*, *D. gigantea* e *T. barclayana*. No entanto, para *R. oryzae* e *P. oryzae*, as concentrações de CO₂ atmosférico, entre 544 a 650 ppm, proporcionaram aumento na incidência e severidade das doenças em plantas de arroz, sendo relacionado com a menor concentração de silício nas mesmas. Sendo o silício um elemento crucial para as plantas por compor constituintes de ação de

defesa estrutural e bioquímica do tecido vegetal (DALLAGNOL et al. 2009; 2011).

Dessa forma, o estudo dos componentes de resistência, além de permitir a separação dos genótipos quanto aos níveis de resistência, também pode fornecer evidências sobre os possíveis mecanismos envolvidos na suscetibilidade ou resistência da planta ao patógeno, que pode ser de origem estrutural ou bioquímica (ZHANG et al., 2013). Nos mecanismos bioquímicos se encontram diversas substâncias, oriundas tanto do metabolismo primário, quanto do secundário, como forma de atenuar os efeitos deletérios causados pelo patógeno (DALLAGNOL et al., 2013; DORNELES et al., 2017).

Simultaneamente, as pesquisas têm demonstrado que a elevação do CO₂ na atmosfera, promove nas espécies cultivadas alterações a nível de transcriptoma, metaboloma e proteoma (MISRA; CHEN, 2015; XU et al., 2015). Para o arroz as evidências indicam que o incremento na disponibilidade de CO₂ confere inúmeras alterações, entre elas, o aumento na atividade fotossintética, na concentração de carboidratos e compostos fenólicos, na atividade de enzimas e do potencial redox celular (GOUFO et al., 2014; ZHU et al., 2014; MHAMDI; NOCTOR, 2016).

Para a mancha parda, na interação entre o arroz - *B. oryzae*, o patógeno objetiva colonizar o tecido do hospedeiro para obter nutrientes, para isso, dispõem de enzimas e toxinas, com função de desencadear o colapso celular através da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (SUNDER et al., 2014). Diante disso, pressupomos que os menores valores da severidade da mancha parda em altas concentrações de CO₂, esteja relacionado ao possível aumento nos níveis de compostos antioxidantes, incluindo os enzimáticos e não-enzimáticos, aumentando a capacidade antioxidante da planta e atenuando os níveis das espécies reativas de oxigênio, reduzindo os seus efeitos deletérios.

Ademais, altas concentrações de CO₂ mostram ter influência positiva na fotossíntese, elevando a sua taxa líquida, conseqüentemente originando e potencializando o acúmulo de substâncias ricas em energias (açúcares) (MISRA; CHEN, 2015). Embora não tenham sido quantificados neste estudo, acredita-se que o aumento na concentração de açúcares nas plantas de arroz cultivadas em elevada concentração de CO₂, tenha influenciado na atenuação

da mancha parda e intensificado a severidade da brusone. Estudo realizado por Dallagnol et al. (2013) constatou que o aumento na concentração de açúcares no arroz foi desfavorável para o progresso da mancha parda.

Os açúcares, além de ser a fonte de energia para a síntese de metabolitos secundários associados com a defesa da planta contra patógenos (MOHAMMAD; WIM, 2012), promovem o acúmulo de peróxido de hidrogênio, nas fases iniciais da infecção, a expressão de PR proteínas e atuam como moléculas *priming*, ativando a cascata de sinalizações (MORKUNAS; RATAJCZAK, 2014).

Em contrapartida, para determinadas doenças, principalmente aquelas causadas por patógenos biotrófico ou hemibiotrófico, como a *P. oryzae*, o aumento na concentração de açúcares, influencia na suscetibilidade do hospedeiro (CHOWDHURY et al., 2017). Plantas de arroz com maior severidade da queima bacteriana, causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, apresentaram maior concentração de açúcares (DATNOFF et al., 2007), bem como, Prabhu et al. (2007) verificaram que as folhas de arroz com maior severidade de brusone, foram as que apresentaram maior concentração de açúcares.

Entretanto, para a mancha ocular por ser uma doença relatada recentemente na cultura, informações sobre a forma de parasitismo de *D. gigantea*, ainda se encontram limitadas, sendo difícil, supor as vias que proporcionaram essa interação positiva e também de que forma isso foi influenciado pelo CO₂.

Em relação ao controle químico, de maneira geral sua efetividade é dependente da combinação correta de inúmeros fatores, dentre eles a dose e a época de aplicação (STEFANELLO et al., 2012). Assim, a ocorrência das doenças aos 28 dias após a aplicação do fungicida, resultou em sua baixa eficácia, devido estar findando o período residual de controle para os ingredientes ativos utilizados. Entretanto, vale ressaltar que a 700 ppm de CO₂ a severidade da mancha parda e da mancha ocular foi reduzida em resposta ao fungicida, principalmente na cv. BRS Querência, classificada como mais suscetível a doenças. As informações sobre as interações entre pesticidas e o aumento do CO₂, ainda são sucintas na literatura. Entretanto, Gilardi et al. (2017) relataram que a eficácia do mancozebe e da azoxistrobina no controle

de *Phoma betae* em beterraba, foi significativamente melhorada em 15,3% e 20,6%, respectivamente, sob 800-850 ppm de CO₂ e 22-26°C, em comparação com a eficácia observada sob condições atual de CO₂.

Para a *T. barclayana* de maneira geral, tanto o fator CO₂, quanto o fator cultivar ou até mesmo a aplicação do fungicida, não apresentaram influência na sua incidência e severidade. O efeito da fertilização com CO₂ em fungos biotróficos tem demonstrado ser variável, conforme as informações disponíveis na literatura, havendo casos de aumento e casos de redução da severidade da doença, sendo essas variações associadas à variação do sistema inato de defesa do hospedeiro em consequência do CO₂ (LUCK et al., 2011; ABDELGAWAD et al., 2016; WILLIAMS et al., 2018). Ademais, a baixa eficiência do fungicida para a cárie do arroz, possivelmente, esteja relacionado a sua aplicação precoce, nesse estudo, em estágio vegetativo. Segundo Zemolin et al. (2009) aplicações de trifloxistrobina + propiconazol no final do emborrachamento e pré-florescimento são as épocas mais indicadas como tentativa de controle dessa doença.

Em resumo, as alterações no metabolismo e processos fisiológicos, causadas pela maior disponibilidade de CO₂ na atmosfera, pode resultar, de maneira indireta ou direta, no incremento da resistência das cultivares de arroz aos mais variados estresses (ABDELGAWAD et al., 2016; WILLIAMS et al., 2018). No entanto, para o estresse biótico causado por patógenos, é temerário concluir sobre uma tendência geral, se essas alterações metabólicas e fisiológicas serão positivas ou negativas, para um único vértice do triângulo da doença. O que podemos observar é que cada patossistema se comporta de forma específica diante do incremento da concentração de CO₂, demonstrando a necessidade de investigar quais mudanças no hospedeiro em consequência do aumento do CO₂ influenciam na maior ou menor severidade da doença. Essas informações serão úteis para melhoristas de plantas no desenvolvimento de cultivares e fitopatologistas para as estratégias de uso das medidas de manejo de doenças de plantas em condições futuras.

3 Capítulo 2. Respostas bioquímicas do arroz contra *Bipolaris oryzae* aumentam em elevada concentração atmosférica de CO₂.

3.1 Introdução

A mancha parda do arroz, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker teleomorfo *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib) ocorre em todas as regiões orizícolas e é considerada uma das principais doenças da cultura. Como ocorrido na “Fome de Bengala em 1942” (SUNDER et al., 2014), esse patógeno, quando assume caráter epidêmico, pode causar redução no rendimento de grãos de até 90%. O dano está associado à redução no menor número e peso de grãos por panícula, bem como à sua menor qualidade devido ao escurecimento e redução da porcentagem de grãos inteiros após beneficiamento (BARNWAL et al., 2013).

O dano no rendimento está relacionado à ocorrência do patógeno na panícula, causando a esterilidade dos órgãos florais, e também pelo impacto negativo da mancha parda na área foliar e capacidade fotossintética da planta, devido à clorose e a necrose do tecido vegetal (SUNDER et al., 2014; DALLAGNOL et al., 2015). A clorose e a necrose são resultado da ação das toxinas Ofiobolina A e Ofiobolina B, produzidas pelo fungo e secretadas durante o seu processo de colonização, contribuindo substancialmente para a severidade da doença (XIÃO et al., 1991). As toxinas atuam suprimindo as defesas das plantas ou agindo em pontos específicos na célula do hospedeiro, principalmente no processo fotossintético, levando ao estresse oxidativo e a ocorrência da peroxidação lipídica, que conseqüentemente resulta no colapso celular (DALLAGNOL et al., 2011; MENGISTE et al., 2012).

Atualmente, o manejo da doença está fundamentado no uso de práticas culturais para redução do inoculo inicial, como rotação de culturas e sementes saudáveis, e medidas para redução da taxa de progresso da doença por meio do uso de cultivares mais resistentes, aplicação de silício e uso de fungicidas, tanto no tratamento de sementes, quanto na aplicação via foliar (SUNDER et al., 2014). No entanto, variações dos elementos climáticos podem tornar as práticas atualmente empregadas no manejo da mancha parda insatisfatórias, especialmente as que afetam a taxa de progresso da doença, já

que as mesmas estão estritamente relacionadas com aspectos fisiológicos e metabólicos da planta.

Dentre os elementos climáticos está o dióxido de carbono (CO₂) o qual tem apresentado um acelerado aumento na sua concentração atmosférica nos últimos anos passando de 280 ppm para 379 ppm em 2005. Além disso, estima-se que se a tendência persistir no ano 2100, a concentração atmosférica de CO₂ estará em torno de 750 a 1020 ppm (IPCC, 2014).

Do ponto de vista fisiológico, geralmente a elevação da concentração de CO₂ atmosférico promove benefícios para a planta, através de alterações no metabolismo e crescimento (XU; JIANG; ZHOU, 2015). Entretanto, é importante destacar que, essas alterações morfofisiológicas na planta, podem modificar a intensidade de ocorrência de algumas doenças por interferir na relação patógeno-hospedeiro (CHAKRABORTY et al., 2008; EASTBURN; MCELTRONE; BILGIN, 2011). Acredita-se que as alterações podem afetar a durabilidade efetiva da resistência das plantas devido ao desenvolvimento acelerado das populações dos patógenos ou, também, alteração das respostas de defesas da planta contra o agente patogênico (EASTBURN; MCELTRONE; BILGIN, 2011). Alguns estudos foram desenvolvidos em situações de atmosfera controlada na busca por respostas, porém ainda não está claro qual será o efeito das mudanças climáticas na severidade das doenças dentre os mais variados patossistemas (CHAKRABORTY et al., 2005; 2011).

Não obstante, devido à escassez de pesquisas em relação ao comportamento de patógenos e sua importância epidemiológica neste cenário atual, no qual são estipuladas mudanças drásticas no clima mundial, questionamentos começam a ser levantados sobre as consequências das alterações na interação patógeno-hospedeiro. Dentre os inúmeros vértices que compõem as interações que resultam em resistência ou suscetibilidade do hospedeiro, o sistema antioxidante, enzimático e não enzimático, desempenham papel fundamental nas defesas de plantas a patógenos (XU; JIANG; ZHOU, 2015). Considerando que *B. oryzae* estabelece relação parasitária necrotrófica com seus hospedeiros, causando estresse oxidativo na planta, especialmente pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), para matar as células hospedeiras e, assim, obter seus nutrientes (MENGISTE,

2012), o sistema antioxidante tem capacidade para manter o equilíbrio entre a produção e a remoção de ROS (BARBOSA et al., 2014).

Neste contexto, a hipótese deste estudo é que o aumento na concentração de CO₂ atmosférico pode potencializar as respostas de defesa, como, por exemplo a atividade de enzimas hidrolases (quitinase) e oxidoreduções (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidases, peroxidase, polifenoloxidase), a concentração de compostos fenólicos e lignina, bem como, atenuar o dano as membranas celulares e o extravasamento de eletrólitos. Para testar esta hipótese, as respostas de defesa supramencionadas foram quantificadas em diferentes momentos da patogênese de *B. oryzae* em plantas de arroz de uma cultivar resistente e uma suscetível à mancha parda [segundo a classificação da SOSBAI (SOSBAI, 2016)] cultivadas em ambiente com 400 e 700 ppm de CO₂ atmosférico.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz

As cultivares de arroz BRS Querência (Embrapa®) e Inov CL (Ricotec®), suscetível e resistente, respectivamente, segundo a classificação da SOSBAI (SOSBAI, 2016), foram utilizadas nos experimentos. A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade de 2 litros, contendo aproximadamente 1,5 kg de solo peneirado, que teve sua fertilidade química corrigida conforme as indicações técnicas para a cultura do arroz irrigado (SOSBAI, 2016), sendo na sequência, alocados em suas respectivas OTCs.

As estufas de topo aberto (“open-top chambers”, OTC) conforme descrito no capítulo 1, foram reguladas para as concentrações, de 400 ppm CO₂, pois é considerada como atual no ambiente (teste controle) e em 700 ppm CO₂, prevista para no ano de 2050 (IPCC, 2014).

3.2.2 Delineamento experimental

Os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado. Para a quantificação dos componentes de resistência foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 onde os fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL) e duas concentrações de CO₂ (400 e 700

ppm CO₂), com quatro repetições cada uma consistindo de uma planta. Para a quantificação dos extravasamentos de eletrólitos foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 × 2 onde os fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL), duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂) e inoculação (com ou sem inoculação com *B. oryzae*) com quatro repetições cada uma consistindo de uma planta. Para as análises bioquímicas foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 × 2 × 5 onde os fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL), duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂), inoculação (com ou sem inoculação com *B. oryzae*) e tempos de amostragem (12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação) com quatro repetições cada uma consistindo de uma planta. O experimento foi repetido duas vezes.

3.2.3 *Obtenção do inóculo, procedimento de inoculação e avaliação dos componentes de resistência*

O isolado LIPP042015 de *B. oryzae* utilizado no estudo foi obtido a partir de sementes contaminadas da cultivar IRGA 424. A preservação do fungo foi pelo método do papel filtro em frasco de vidro contendo sílica gel a 4°C (DALLAGNOL et al., 2009). E para o seu cultivo em meio de cultura, pedaço do papel filtro contendo o fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo a base de batata-dextrose-agar (BDA) a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

O preparo da suspensão de inóculo foi conforme descrito em Dallagnol et al. (2009) e a inoculação realizada em folhas de plantas de arroz no estágio fenológico V₇-V₈ [segundo escala de Counce, (2000)] por meio da pulverização da suspensão de 1 × 10⁴ conídios por mL⁻¹ com auxílio de atomizador manual (Tecblas, REF: 359 – 60 mL / Porto Alegre, Brasil). Imediatamente após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições de câmara úmida, com umidade relativa superior a 95%, com auxílio de umidificador (Soniclear®, Waterclear Max) à 25 ± 2 °C. Após 48 horas a condição de câmara úmida foi retirada e as plantas permaneceram em ambiente com umidade relativa em torno de 70%, temperatura de 25 ± 2 °C. As plantas controles, não inoculadas, foram pulverizadas com água destilada e expostas às mesmas condições das

plantas inoculadas. As plantas permaneceram dentro das respectivas OTCs durante as 48 horas de câmara úmida.

Os componentes de resistência eficiência relativa de infecção (ERI), número inicial de lesão (NIL), número final de lesão (NFL), taxa de expansão da lesão (r); comprimento final da lesão (CFL); e a severidade final (SF) foram avaliadas, seguindo a metodologia descrita por Dallagnol et al. (2009). As avaliações da r , CFL e SF ocorreram em folhas da parte superior (oitava, sétima e sexta folha) e inferior da planta (quarta, terceira e segunda folha) do colmo principal, de acordo com a Figura 5, devido a taxa de progresso da mancha parda ser mais intensa em folhas mais velhas.

A ERI é a proporção, em porcentagem, de conídios que conseguiram estabelecer sítio de infecção. Para obter a ERI, duas lamínulas (20 × 20 mm) por repetição de cada tratamento foram aderidas na superfície adaxial das folhas antes da inoculação, e, posteriormente, realizada a contagem do número de conídios sob microscópio. Transcorridas 24 horas do período de incubação, com auxílio de uma lupa de bolso foi realizada a contagem do número de lesões por cm^{-2} de área foliar. A razão entre o número de lesões cm^{-2} e o número de conídios por cm^{-2} foi definido como a ERI. O NIL (cm^{-2}) foi quantificado após o ERI, e indica o número de sítios de infecção por unidade de área. O NFL (cm^{-2}) foi quantificado ao final das avaliações, e indica o número de sítios de infecção por unidade de área que efetivamente se desenvolveram. A r indica a velocidade, em função do tempo, da colonização dos tecidos da planta pelo patógeno. A r foi obtida através da regressão linear das mensurações de cinco lesões em uma folha por planta, de cada repetição, a cada 24 h após o período de incubação. O CFL (mm) foi medido aos 17 dias após a inoculação (dai) em cinco lesões, selecionadas aleatoriamente, na região central de duas folhas de uma planta por repetição, utilizando-se um paquímetro eletrônico digital. A SF em porcentagem (%) da mancha parda foi estimada através do software para quantificação de doenças de plantas QUANT[®] (UFV, Brasil) aos 17 dai.

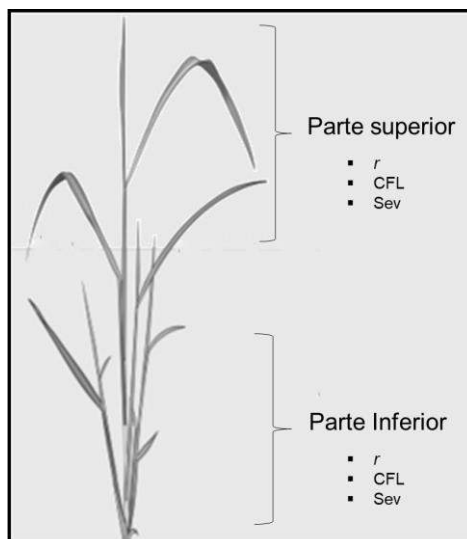


Figura 5. Representação da parte superior e inferior da planta de arroz, onde foram quantificados a taxa de expansão de lesão (r), comprimento final de lesão (CFL) e severidade (Sev) da mancha parda.

3.2.4 Determinação da atividade das enzimas, concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST), derivados lignina-ácido tioglicólico (DLATG), de aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos (EE).

As análises bioquímicas foram realizadas utilizando todas as folhas do colmo principal de cada planta. As folhas foram amostradas às 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai). Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas usando nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C . Para cada tempo de amostragem foram utilizadas quatro repetições cada uma constituída por uma planta.

Atividade enzimática. O extrato bruto usado para a determinação das atividades enzimáticas foi obtido conforme Dorneles et al. (2017).

Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e quitinase (QUI) foram determinadas conforme descrito em Dorneles et al. (2017). Em resumo, a atividade da enzima SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada por meio da quantificação colorimétrica da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A atividade específica da SOD, correspondeu à quantidade da enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT, nas condições do teste, sendo os resultados expressos em unidades

de SOD mg^{-1} de proteína. A atividade da enzima CAT (EC 1.11.1.6) foi definida através quantificação da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Merck, São Paulo, Brasil) em espectrofotômetro (model UV-UM51- Bel[®]) e expressos em μmol de H_2O_2 degradado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A atividade das enzimas POX (EC 1. 11. 1. 7) e PPO (EC 1. 10. 3. 1) foram determinadas pela quantificação colorimétrica da oxidação do pirocatecol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Sendo a atividade expressa mol de purpurogalina produzida por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da QUI (EC 3.2.1.14) foi determinada por meio da quantificação colorimétrica da liberação de “pnitrophenyl” clivado do substrato análogo da quitina “p-nitrophenyl- β -D-N,N'- diacetylchitobiose”(PNP) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e expressa em mM de “p-nitrophenyl” produzido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX EC 1. 11. 1. 11) foi quantificada conforme descrito em Nakano; Asada (1981) baseado na quantificação da taxa de oxidação do ascorbato (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e expressa em μmol de ascorbato oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A concentração de proteínas utilizada para o cálculo da atividade das enzimas foi obtida pelo método de Bradford, usando albumina sérica bovina como padrão.

Concentração de compostos fenólicos solúveis totais. Os compostos fenólicos solúveis totais (CFST) foram extraídos de 0,1 g de amostras foliares de acordo com Dallagnol et al. (2015). A concentração de CFST foi determinada utilizando o reagente de fenol Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A concentração de CFST foi expressa em termos de ácido pirogálico, em μg de CFSTs g^{-1} matéria fresca (mf). Para determinação da curva padrão para quantificação dos CFSTs foi utilizado o ácido Pirogálico P.A.-A.C.S. (Synth[®]).

Derivados lignina-ácido tioglicólico (DLATG). Para determinação da concentração dos DLATG utilizou-se o método descrito em Dorneles et al. (2017), onde o resíduo insolúvel obtido da extração dos compostos fenólicos foi usado para determinar a concentração de lignina usando ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A concentração de DLATG foi expressa em $\mu\text{g} \text{g}^{-1}$ mf, utilizando uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2- hidroxipropílico de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

Determinação da concentração de aldeído malônico. A concentração de aldeído malônico (MDA) foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Merck, Alemanha), segundo Cakmak; Horst (1991). Para isso, 0,2 g de folhas foram macerados com nitrogênio líquido, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, Synth) 0,1% (m/v). Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) em ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração de MDA, foi utilizado o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹cm⁻¹ e os valores expressos em μmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca (mf).

Extravasamento de eletrólitos (EE). A quantificação da concentração de eletrólitos extravasados foi determinada conforme metodologia descrita por Lima et al. (2002), com algumas modificações. Foram coletados 16 discos foliares (7 mm) de folhas do colmo principal de plantas da cv. BRS Querência e Inov CL, cultivadas em ambiente com 400 e 700 ppm CO₂ atmosférico (700 ppm) as quais foram ou não inoculadas com *B. oryzae* aos 17 dias após a inoculação. Os discos obtidos foram lavados por duas vezes em água deionizada imediatamente após o corte. Em seguida, os discos foram incubados em 30 mL de água deionizada a 25°C. Após quatro horas, foi realizada a primeira leitura da condutividade elétrica (CE1) em condutivímetro (Tecno pon mCA-150 - MS Tecno pon Instrumentação Científica). Logo em seguida, as amostras foram incubadas a 90°C, por duas horas, sendo, então, determinada a condutividade elétrica novamente (CE2). O valor do extravasamento de eletrólitos foi obtido pela porcentagem de eletrólitos extravasados em relação aos eletrólitos totais conforme a seguinte fórmula:

$$EE(\%) = \left(\frac{EC1}{EC2} \right) \times 100$$

3.2.5 Análises dos dados

Para evidenciar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de *Shapiro Wilk*, para todas as variáveis realizadas nos experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos

tratamentos comparadas pelo teste de Student (teste-*t*) no software SAS (SAS Institute, 1989, Cary, NC).

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito do CO₂ nos componentes de resistência

Não ocorreu interação entre os fatores cultivar e concentração de CO₂. O fator cultivar somente foi significativo para o número final de lesão (Tabela 5) e o comprimento final de lesão (Tabela 6), que respectivamente, foram 22 e 6% menor na cv. Inov CL quando comparado com a cv. BRS Querência.

Tabela 5. Eficiência relativa de infecção (ERI), número inicial de lesão (NIL) e número final de lesão (NFL) da mancha parda em plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂).

Cultivares	ERI (%)	NIL	NFL
BRS Querência	9,19 a	5,33 a	6,64 a
Inov CL	8,36 a	4,85 a	5,16 b
CV %	23,67	23,67	16,94
Concentração de CO₂			
400 ppm	10,45 a	6,00 a	6,60 a
700 ppm	7,11 b	4,12 b	5,20 b
CV%	13,12	13,12	17,51

Em cada variável, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar ou concentração de CO₂ pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Taxa de expansão da lesão (*r*), comprimento final da lesão (CFL) e severidade final (Sev) da mancha parda aos 17 dias após a inoculação de *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂).

Cultivares	Parte superior			Parte inferior		
	<i>r</i>	CFL (mm)	Sev (%)	<i>r</i>	CFL (mm)	Sev (%)
BRS Querência	0,0045 a	1,64 a	10,54 a	0,007 a	4,98 a	55,00 a
Inov CL	0,0035 a	1,49 a	9,41 a	0,005 a	4,66 b	48,87 a
CV%	18,69	11,00	16,54	19,30	5,12	13,34
Concentração de CO₂						
400 ppm	0,0049 a	1,72 a	11,97 a	0,0079 a	4,94 a	55,37 a
700 ppm	0,0030 b	1,41 b	7,93 b	0,0055 b	4,70 a	48,50 a
CV%	19,41	6,77	8,50	15,30	5,60	12,95

Para cada variável, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar ou concentração de CO₂ pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

O fator concentração de CO₂ foi significativo para maioria dos componentes de resistências avaliados (Tabela 5 e 6), exceto, para o comprimento final da lesão e severidade final no terço inferior da planta (Tabela 6).

Plantas de arroz à 700 ppm de CO₂ apresentaram redução de 32, 31 e 21%, respectivamente, para a ERI, NIL e NFL, quando comparado as plantas cultivadas a 400 ppm (Tabela 5). O CFL, *r* e a Sev da mancha parda, no terço superior de plantas de arroz à 700 ppm de CO₂ reduziram, respectivamente, 18, 38, e 33% (Tabela 6), enquanto para o terço inferior a redução foi de 30% para a *r* (Tabela 6), quando comparado as plantas cultivadas a 400 ppm de CO₂.

3.3.2 *Efeito do CO₂ nas atividades enzimáticas*

Nas plantas cultivadas à 400 ppm de CO₂, a inoculação do patógeno aumentou a atividade da SOD (Figura 6a), CAT (Figura 6e), APX (Figura 6i), POX (Figura 6m) e QUI (Figura 6u) principalmente às 48 hai para cv. BRS Querência, enquanto para cv. Inov CL aumentou a atividade da APX (Figura 6k) às 72 hai, PPO (Figura 6s) às 24 hai e QUI (Figura 6w) às 24 e 72 hai. Em plantas à 700 ppm de CO₂, a inoculação do patógeno aumentou a atividade da SOD (Figura 6b), CAT (Figura 6f), APX (Figura 6j), e POX (Figura 6n), especialmente às 48 hai, PPO (Figura 6r) de 24 a 48 hai e a QUI (Figura 6v) de 48 até 96 hai para cv. BRS Querência. Para a cv. INOV CL ocorreu aumento da atividade da SOD (Figura 6d) e PPO (Figura 6t) às 12 e 48 hai, CAT (Figura 6h), APX (Figura 6l), e POX (Figura 6p) sobretudo às 48 hai, e a QUI (Figura 6x) de 48 até 96 hai.

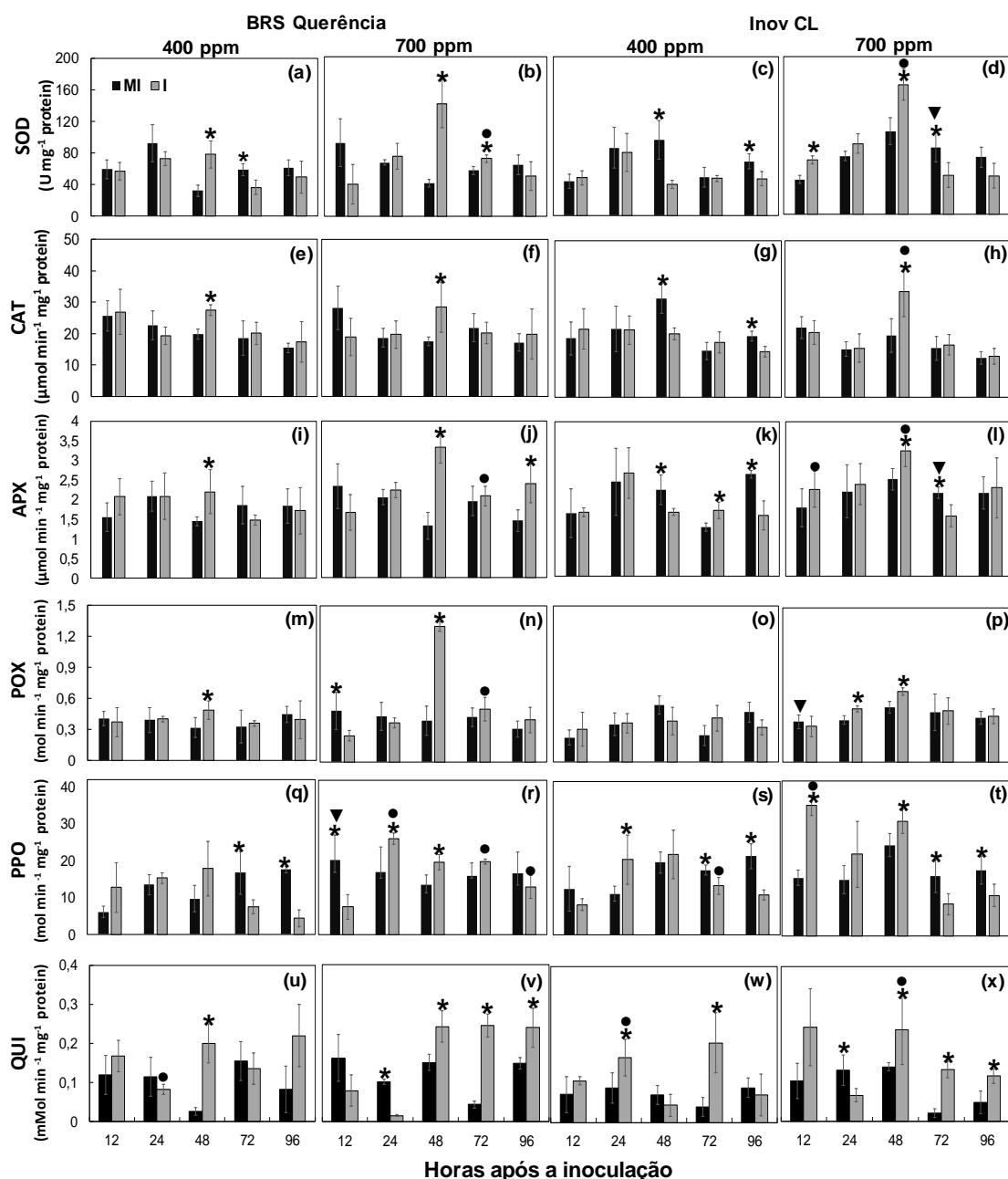


Figura 6. Atividade da enzima superóxido dismutases (SOD) (a; b; c e d), catalase (CAT) (e; f; g e h), ascorbato peroxidase (APX) (i; j; k e L), peroxidase (POX) (m; n; o e p), polifenoloxidase (PPO) (q; r; s e t) e quitinase (QUI) (u; v; w e x) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂.

Por outro lado, a redução na atividade das enzimas, em plantas à 400 ppm de CO₂, ocorreu para a SOD (Figura 6a) às 72 hai, PPO (Figura 6q) as 72 e 96 hai para cv. BRS Querência, enquanto para cv. Inov CL ocorreu a redução da SOD (Figura 6c), CAT (Figura 6g), APX (Figura 6k), basicamente às 48 e 96 hai e a PPO (Figura 6s) as 72 e 96 hai. Já para as plantas à 700 ppm de CO₂, a redução ocorreu para a POX (Figura 6n) e PPO (Figura 6r) às 12 hai e QUI (Figura 6v) às 24 hai na cv. BRS Querência, e para cv. Inov CL ocorreu redução na atividade da SOD (Figura 6d), APX (Figura 6l) às 72 hai, QUI (Figura 6x) às 24 hai e PPO (Figura 6t) de 72 até 96 hai.

Quando comparado plantas inoculadas, cultivadas a 400 ou 700 ppm de CO₂, foi verificado que a suplementação com CO₂ resultou no aumento na atividade da PPO (Figura 6r) às 24, 72 e 96 hai e da SOD (Figura 6b), APX (Figura 6j) e POX (Figura 6n) às 72 hai para cv. BRS Querência. Para a cv. Inov CL o aumento ocorreu para a SOD (Figura 6d), CAT (Figura 6h) e QUI (Figura 6x) principalmente às 48 hai, PPO (Figura 6t) às 12 hai e a APX (Figura 6l) às 12 e 48 hai. Na ausência do patógeno, de maneira geral, não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas para ambas cultivares, pelo efeito da elevação da concentração do CO₂ atmosférico (Figura 6a-x).

3.3.3 Efeito do CO₂ na concentração de compostos fenólicos solúveis totais

Plantas à 400 ppm de CO₂ e inoculadas com o patógeno apresentaram aumento significativo na concentração de CFST às 48 e 96 hai para cv. Inov CL (Figura 7c), enquanto que para cv. BRS Querência não ocorreu diferença significativa (Figura 7a), comparadas a plantas não inoculadas. Nas plantas à 700 ppm de CO₂, a concentração de CFST, em resposta a inoculação do patógeno, aumentou para ambas as cultivares (Figura 7b-d). A concentração foi maior às 12 e 96 hai para cv. BRS Querência (Figura 7b) e 24, 48 e 96 hai para cv. Inov CL (Figura 7d).

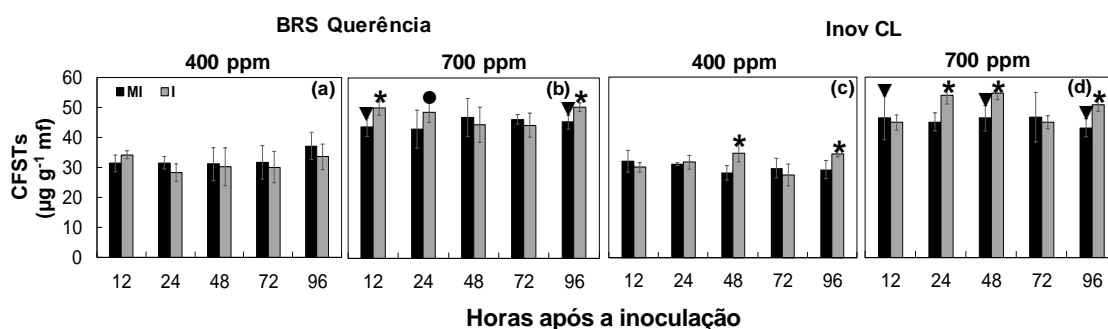


Figura 7. Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂.

Quando comparado plantas inoculadas, cultivadas à 400 ou 700 ppm de CO₂, foi verificado que a suplementação com CO₂ resultou no aumento na concentração de CFST às 24 hai para cv. BRS Querência (Figura 7b). Na ausência do patógeno, plantas à 700 ppm de CO₂ apresentaram maior concentração de CFST às 12 e 96 para a cv. BRS Querência (Figura 7b) e às 12, 48 e 96 hai para cv. Inov CL (Figura 7d), quando comparado a plantas cultivadas à 400 ppm de CO₂.

3.3.4 Efeito do CO₂ na concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (DLATG)

Plantas à 400 ppm de CO₂ e inoculadas com o patógeno apresentaram aumento significativo na concentração DLATG às 96 hai para cv. BRS Querência, quando comparado a plantas não inoculadas (Figura 8a).

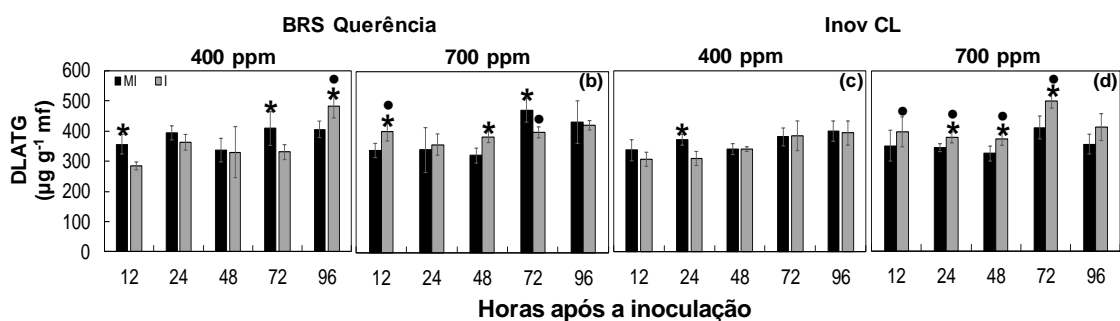


Figura 8. Concentração de derivados lignina-ácido tioglicólico (DLATG) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t* entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂.

Porém, menor concentração significativa de DLATG ocorreu às 12 e 72 para cv. BRS Querência (Figura 8a) e às 24 hai para cv. Inov CL (Figura 8c). Para plantas à 700 ppm de CO₂, a concentração de DLATG, em resposta a inoculação do patógeno, foi antecipada para ambas as cultivares (Figura 8b-d), sendo maior às 12 e 48 hai para cv. BRS Querência (Figura 8b) e de 24 até 72 hai para cv. Inov CL (Figura 8d).

Comparando plantas inoculadas com e sem elevação da concentração de CO₂, de maneira geral, a suplementação com CO₂ resultou no aumento na concentração de DLATG às 12 e 72 hai para cv. BRS Querência (Figura 8b), e das 12 até as 72 hai para cv. Inov CL (Figura 8d). Na ausência do patógeno não foi observada diferença significativa na concentração de DLATG, para ambas as cultivares, pela elevação da concentração de CO₂ (Figura 8a-d).

3.3.5 Efeito do CO₂ na concentração de aldeído malônico

Plantas inoculadas com o patógeno e cultivadas a 400 ppm de CO₂ apresentaram aumento significativo na concentração de MDA às 12 e 72 hai para a cv. BRS Querência (Figura 9a) e para a cv. Inov CL às 12, 72 e 96 hai (Figura 9c), quando comparado a plantas não inoculadas. Para as plantas a 700 ppm de CO₂, a concentração de MDA, em consequência da inoculação do patógeno, de maneira geral, foi atenuada em ambas cultivares (Figura 9b e d). A concentração de MDA reduziu as 48 hai para cv. BRS Querência (Figura 9b) e para cv. Inov CL, teve aumento as 48 e 96 hai (Figura 9d), quando comparado a plantas não inoculadas.

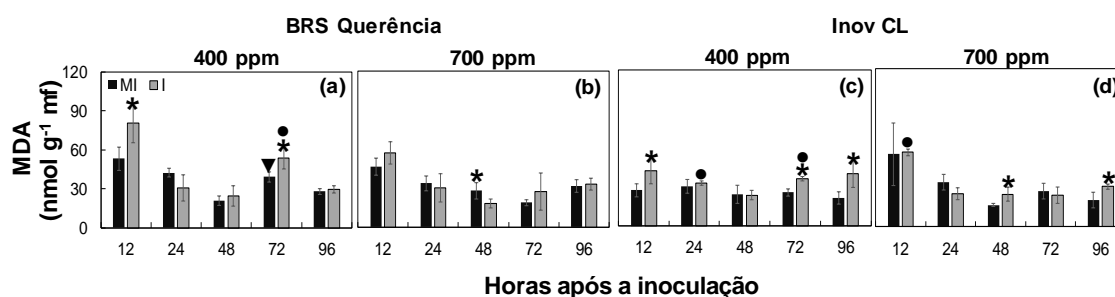


Figura 9. Concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (a-b) e Inov CL (c-d) cultivadas em ambiente sem elevação (400 ppm) ou com elevação do CO₂ atmosférico (700 ppm) e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Barras representam o desvio padrão da média. (*) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , quando comparado plantas não inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (●) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂. (▼) Representa diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t entre plantas não inoculadas cultivadas em 400 ou 700 ppm de CO₂.

Comparando plantas inoculadas, cultivadas com e sem elevação do CO₂, de maneira geral, a suplementação com CO₂ resultou na redução da concentração de MDA às 72 hai (Figura 9a) para cv. BRS Querência e às 24 e 72 hai (Figura 9c) para cv. Inov CL. Na ausência do patógeno, não foi observada diferença significativa na concentração de MDA, para ambas as cultivares, pela elevação da concentração de CO₂ (Figura 9a-d).

3.3.6 Efeito do CO₂ no extravasamento de eletrólitos

Não ocorreu interação entre os fatores cultivar, concentração de CO₂ e inoculação para o extravasamento de eletrólitos. O fator cultivar foi significativo para o extravasamento de eletrólitos (Tabela 7), com aumento de 11% na cv. BRS querência quando comparado com a cv. Inov CL.

Tabela 7. Extravasamento de eletrólitos em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂ aos 17 dias após a inoculação com *Bipolaris oryzae*.

Cultivares	Extravasamento de eletrólitos (%)
BRS Querência	18,41 a
Inov CL	16,62 b
CV%	11,28
Concentrações de CO₂ atmosférico	
400 ppm	17,80 a
700 ppm	17,23 a
CV%	12,34
Inoculação	
Não Inoculado	16,38 b
Inoculado	18,65 a
CV%	10,51

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

A concentração de CO₂ não apresentou diferença significativa para o extravasamento de eletrólitos. Porém, a inoculação do patógeno aumentou o extravasamento de eletrólitos em 14%, comparado às plantas não inoculadas (Tabela 7).

3.4 Discussão

A severidade da mancha parda foi atenuada nas cultivares de arroz quando cultivados em maior concentração de CO₂ atmosférico. Os menores valores da severidade da doença foram relacionados a alterações no desenvolvimento das lesões, resultante das respostas de defesa, que foram estimuladas na planta de arroz pelo aumento da concentração de CO₂.

A redução na intensidade de mancha parda pelo aumento na concentração de CO₂ ficou evidente pelos componentes de resistência, onde a eficiência relativa de infecção (ERI), o número inicial e final de lesões (NIL e NFL), a taxa de expansão da lesão (r), o comprimento final da lesão (CFL) e a severidade final (Sev) foram menores em plantas a 700 ppm de CO₂, independente da cultivar. Os menores valores para os componentes de resistência representam a capacidade da planta em restringir o processo de infecção, colonização e reprodução do patógeno (DALLAGNOL et al., 2009).

O comportamento epidemiológico da mancha parda também demonstrou ser variável entre as folhas novas (parte superior) e folhas velhas (parte inferior) da planta. Sendo que em plantas a 700 ppm o progresso da doença, foi atenuado, independentemente da idade fisiológica da folha. A relação entre idade fisiológica do tecido vegetal e sua suscetibilidade a patógenos é uma característica de inúmeros patossistemas, sendo as folhas mais velhas em processo de senescência, as mais predispostas à infecção e colonização pelo patógeno, especialmente os necrotróficos (MENGISTE, 2012).

Dessa forma, a hipótese da redução da mancha parda nas folhas mais velhas em condições de CO₂ elevado é que a maior concentração de CO₂ esteja retardando o processo de senescência da folha e assim mantendo a sua integridade celular e a capacidade de produzir transcritos relacionados à resposta de defesa. Pesquisas têm demonstrado que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico induz o acúmulo de carboidratos que atuam, junto com outras vias, na sinalização envolvida na senescência foliar (AGÜERA; DE LA HABA, 2018). Em *Populus tremuloides*, a elevação na concentração de CO₂ de 400 ppm para 550 ppm retardou a senescência das folhas, fato que foi associado a regulação positiva dos genes que determinam a produção de antocianina, a qual desempenha papel protetor no metabolismo

da planta, aumentando a longevidade das folhas (TAYLOR et al., 2008). Entretanto, conforme Agüera; De La Haba (2018) em condições onde a planta se encontra em desequilíbrio nutricional, principalmente pela deficiência de nitrogênio, esse quadro torna se o inverso, e o aumento na concentração de CO₂, tende a acelerar o processo de senescência das folhas.

Ademais, a variação nos componentes de resistência representa a sumarização dos mecanismos de defesa da planta, os quais limitam o desenvolvimento do patógeno, por meio de barreira estrutural ou bioquímica (ZHANG et al., 2013). Sendo que, a resistência da planta está diretamente relacionada com a eficiência dessas respostas de defesa ao ataque do patógeno.

Em vista disso, como resposta inata do hospedeiro, foi observado que na cultivar BRS Querência, a presença do patógeno desencadeou a ativação de enzimas, como: SOD, CAT, APX, POX e a QUI. Já na cultivar Inov CL, as principais respostas de defesa ativadas foram as enzimas APX, PPO e QUI. Essas enzimas hidrolases e oxido-redutases, produzidas pela planta são de suma importância para a resistência ao estresse biótico, pois agem diretamente sobre o patógeno ou limitam a propagação dos processos oxidativos (PRASANNATH, 2017). No entanto, considerando o desenvolvimento da doença, fica evidente que mesmo havendo a intensificação na atividade das enzimas, essas não foram o suficiente para evitar o processo de patogênese, levando à clorose e necrose do tecido foliar.

Por outro lado, nas plantas expostas a 700 ppm de CO₂ ocorreu antecipação, potencialização e prorrogação na atividade tanto de enzimas oxido-redutases, quanto de hidrolases e na concentração de compostos fenólicos e lignina, independente do cultivar. Esse fato pode ter inibido ou retardado a infecção nas células epidérmicas pelo *B. oryzae* e sua posterior colonização do tecido vegetal resultando na redução dos componentes de resistência. Considerando que o *B. oryzae*, no seu processo colonização, desenvolve-se no meio intercelular do parênquima lacunoso, dispondo de substâncias com função de desencadear o colapso celular através da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, despolarização do potencial elétrico transmembrana e do fluxo de potássio (PANDEY, 2018). Assim, em ambiente enriquecido com CO₂, a eficiência do sistema antioxidante nas

plantas de arroz foi potencializada, atenuando os efeitos deletérios causados pelo patógeno e permitindo que as células mantivessem a sua integridade e viabilidade, comprovado pelo MDA, um marcador bioquímico desse dano celular, bem como, pelo extravasamento de eletrólitos (MITTLER, 2002).

Além do mais, podemos aferir que o aumento na concentração atmosférica de CO₂ proporcionou maior reforço da parede celular, dado ao aumento na concentração tanto de CFST e DLATG, logo nas primeiras horas após a inoculação. Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, via que já demonstrou ser potencializada pela elevação na concentração do CO₂ tanto em *Arabidopsis* sp., quanto no arroz (GOUFO et al., 2014; NOCTOR; MHAMDI, 2017). A forma, como o CO₂ atua nas vias de defesa da planta está relacionada a sua influência positiva no metabolismo primário, que conseqüentemente origina o acúmulo de substâncias ricas em energias, como carboidratos e aminoácidos, que são utilizados nos mais variados processos celulares da planta, incluindo a síntese de compostos oriundos do metabolismo secundário, que apresentam ação direta ou indireta contra patógenos (NOCTOR; MHAMDI, 2017; WILLIAMS et al., 2018). Os CFSTs são compostos considerados antifúngicos e estão envolvidos no reforço da parede celular quando acumulados de forma rápida em sítios de infecção, o que é de suma importância para restringir a infecção pelo patógeno (DORNELES et al., 2018). Adicionalmente, os fenóis também podem ter sido oxidados pela enzima PPO (evidenciado pela sua antecipação no aumento da atividade nas primeiras 12 h em condições de CO₂ elevado) levando a formação de quinonas, que são tóxicas aos patógenos. As quinonas também podem se ligar a proteínas e a carboidratos, produzindo compostos que atuam com barreira física aos patógenos (PRASANNATH, 2017).

Os resultados de pesquisa têm demonstrado que o CO₂ elevado na atmosfera aumenta os níveis de compostos antioxidantes, incluindo os enzimáticos e não-enzimáticos, aumentando a capacidade antioxidante da planta e atenuando os níveis das espécies reativas de oxigênio (XU; JIANG; ZHOU, 2015; WILLIAMS et al., 2018). Em plantas de trigo infectadas com *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) a infecção pelo vírus diminuiu as concentrações totais de ascorbato (ASC) foliar e glutathione (GHS) e aumentou a de desidroascorbato (DHA) e dissulfureto de glutathione (GSSG), que são

considerados como marcadores de estresse oxidativo. Por outro lado, em 650 ppm de CO₂ atmosférico ocorreu redução do DHA e GSSG, aliviando o estresse oxidativo, sendo essa resposta, relacionada a uma possível intensificação da capacidade antioxidante da planta (VANDEGEER; POWELL; TAUSZ, 2016). Plantas de *Beta vulgaris* a 570 ppm de CO₂ também apresentaram aumento na atividade da APX e na concentração de CFST (KUMARI et al., 2013).

Salienta-se ainda, atuação do aumento na concentração de CO₂ na rede de sinalização hormonal, que desempenha um papel fundamental no sistema imune da planta. A concentração de 800 ppm de CO₂ estimulou a via hormonal do ácido jasmônico (JA) / etileno (ET) nas plantas de *Arabidopsis* sp. aumentando a sua resistência ao *Botrytis cinerea* (ZHOU et al., 2016). Porém, em contraste, plantas de tomate e soja mostraram que níveis elevados de CO₂ induziram a via de sinalização do ácido salicílico (AS) e reprimiram a via de sinalização do JA, levando a uma maior resistência à *Pseudomonas syringae* e maior suscetibilidade a patógenos necrotróficos e herbívoros (ZAVALA et al., 2008; ZHANG et al., 2015). Os diferentes efeitos relatados pela elevação do CO₂ atmosférico na sinalização hormonal, podem ser atribuídos às diferentes espécies de plantas examinadas, diferenças nos tratamentos de CO₂ - concentrações de CO₂ e duração dos tratamentos de CO₂ - ou outras condições experimentais aplicadas nos diferentes estudos.

Por fim, evidencia-se que os impactos do aumento da concentração do CO₂ atmosférico em doenças de plantas têm recebido cada vez mais atenção, mas com pouco consenso sobre como o CO₂ interfere na resistência da planta (EASTBURN; MCELRONE; BILGIN, 2011).

Neste estudo, conclui-se que a concentração de 700 ppm de CO₂, proporciona em cultivares de arroz atenuação de danos oxidativos e da severidade da mancha parda, causada pelo *B. oryzae*, através da potencialização na atividade de enzimas antioxidantes e acúmulo de compostos fenólicos e lignina. Estudos que demonstram o efeito do CO₂ na capacidade antioxidante da planta contra estresses abióticos como estresse hídrico e temperatura, estão disponíveis na literatura (XU; JIANG; ZHOU, 2015), porém em relação ao patossistema *B. oryzae*, essas são primeiras

informações de sua interação oxidativa com hospedeiro, em simulação de condições climáticas futuras.

4 Capítulo 3. Aumento na concentração de CO₂ atmosférico altera as respostas fisiológicas, bioquímicas e histológicas do arroz contra *Bipolaris oryzae*.

4.1 Introdução

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker é o agente causal da mancha parda, a qual é uma das principais doenças do arroz, que está presente em todas as regiões de cultivo desse cereal (SUNDER et al., 2014). Os danos no rendimento de grãos variam amplamente de 4 até 52% (BARNWAL et al., 2013), e está relacionado à ocorrência do patógeno na panícula, causando a esterilidade dos órgãos florais, e também devido ao impacto negativo da mancha parda na área foliar, devido à clorose e a necrose do tecido vegetal, reduzindo a capacidade de produção de fotoassimilados (SUNDER et al., 2014; DALLAGNOL et al., 2011).

Os sintomas da doença na folha são resultantes da ação das toxinas Ofiobolina A e Ofiobolina B, produzidas pelo fungo e secretadas durante o seu processo de colonização, contribuindo substancialmente para a severidade da doença (XIÃO et al., 1991). As toxinas atuam suprimindo as defesas das plantas ou agindo em pontos específicos na célula do hospedeiro, principalmente no processo fotossintético, levando ao estresse oxidativo e à ocorrência da foto-oxidação da clorofila, peroxidação lipídica, e, por fim, ocorrendo o colapso celular (DALLAGNOL et al., 2011; MENGISTE et al., 2012).

Contudo, a severidade da mancha parda é fortemente influenciada pela combinação dos seguintes fatores: grau de resistência das cultivares, equilíbrio nutricional das plantas e, também, pela ocorrência de condições ambientais favoráveis ao progresso da doença (DALLAGNOL et al., 2011; BISWAS; QUIRY; GHOSH, 2018).

O dióxido de carbono (CO₂) está entre os gases que compõem atmosfera. Seu aumento acelerado, conforme constatado nos últimos dois séculos (IPCC, 2014), tem o potencial de impactar em mudanças significativas nas condições ambientais do meio (ABDELGAWAD et al., 2016). Em vista disso, estudos em atmosfera controlada, com as mais variadas culturas incluindo a do arroz, passaram a ser desenvolvidos, para que assim seja

possível vislumbrar as futuras consequências do aumento da concentração do CO₂, principalmente quando associado a fatores de estresse abiótico ou biótico.

Os resultados têm sido promissores, identificando aumento na taxa fotossintética, acúmulo de carboidratos e aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (JAUREGUI et al., 2015; NOCTOR; MHAMDI, 2017). Além disso, tanto alterações hormonais, quanto a expressão gênica e a síntese de proteínas também vêm sendo relatadas em consequência da elevação do CO₂ atmosférico em diferentes espécies de plantas. Todas essas respostas, de maneira geral, tendem atenuar ou compensar os efeitos causados pelo agente estressor, como observado em estudos com estresses abióticos: hídrico, térmico e salino (XU; JIANG; ZHOU, 2015). No caso de estresse biótico, a resposta pode ser mais variável e dependente das interações planta-agente estressor. Para insetos, o aumento na concentração de açúcares e alteração na relação carbono/nitrogênio (C/N) em folhas de soja em condições de 700 ppm de CO₂, afetou negativamente o peso e o tempo de vida das pupas e larvas de *Spodoptera litura* (YIFEI et al., 2018). Para fitopatógenos, a produção e acúmulo de compostos do metabolismo secundários foi relacionado à redução da severidade de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* em *Hordeum vulgare* em 700 ppm de CO₂ (MIKKELSEN; OLSEN; LYNGKJÆR, 2015). Todavia, o CO₂ também tem demonstrado alterar o equilíbrio nutricional da planta, o que pode influenciar na severidade de doenças. Conforme Gória et al. (2013), o aumento da severidade *Magnaporthe oryzae*, possivelmente esteja relacionado com a redução da concentração de silício nas plantas de arroz cultivadas em 544 ppm de CO₂.

Os fitopatógenos, como o *B. oryzae*, visam usufruir da planta, seus compostos produzidos através da fotossíntese e processos relacionados, para suprir suas demandas nutricionais e completar seu ciclo de vida (SUNDER et al., 2014). Assim, as alterações morfofisiológicas na planta, causadas pelo aumento da concentração de CO₂ atmosférico, podem modificar a intensidade da mancha parda por interferir na relação patógeno-hospedeiro.

Neste contexto, a hipótese deste estudo é que o aumento na concentração de CO₂ atmosférico altera anatomia foliar, bem como o sistema fotossintético e acúmulo de carboidratos em plantas de arroz, afetando a severidade da mancha parda. Para testar este pressuposto, os parâmetros mencionados foram quantificados em diferentes momentos da patogênese do *B. oryzae*, em plantas de arroz de uma cultivar resistente e uma suscetível à mancha parda [segundo a classificação da SOSBAI (SOSBAI, 2016)] cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de CO₂ atmosférico.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Área experimental (“open-top chambers”, OTC) e cultivo do arroz

As cultivares de arroz BRS Querência (Embrapa[®]), suscetível, e Inov CL (Ricetec[®]), resistente à mancha parda, foram utilizadas nos experimentos. A semeadura e manejo cultural foram realizados conforme descrito no capítulo 1.

As estufas de topo aberto (“open-top chambers”, OTC), conforme descrito no capítulo 1, foram reguladas para as concentrações de 400 ppm CO₂, considerada como atual no ambiente (teste controle), e 700 ppm CO₂, a qual é prevista para no ano de 2050 (IPCC, 2014).

4.2.2 Delineamento experimental

Os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado. Para os componentes de resistência à mancha parda e os parâmetros anatômicos da folha de arroz foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 onde os fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL) e duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂), com quatro repetições. Para os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e concentração de carboidratos na folha foi considerado o esquema fatorial 2 × 2 × 2 onde os fatores consistiram em duas cultivares (BRS Querência e Inov CL), duas concentrações de CO₂ (400 e 700 ppm CO₂) submetidas ou não a inoculação com *B. oryzae*, com quatro repetição.

4.2.3 Características anatômicas da lâmina foliar do arroz

Amostras, de 1 cm de comprimento, foram coletadas na região central, da oitava folha do colmo principal de plantas de arroz (estágio fenológico V₇-V₈, segundo escala de Counce, 2000), cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico, de quatro plantas de cada cultivar. Imediatamente após a coleta, as amostras foliares foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), e posteriormente, desidratadas em série etílica ascendente e infiltrados em resina plástica (Leica Historesin®) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (ANCAP, modelo. 297) com navalha descartável (Feather). Posteriormente, as secções com 7 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) em tampão fosfato e citrato (pH 4,5) e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck®).

Os cortes foram analisados e as imagens capturadas digitalmente a partir de câmera Leica®, modelo DC 300F acoplada com microscópio Leica®, modelo DMLB. As imagens foram utilizadas para mensuração da espessura do parênquima e as dimensões (comprimento e largura) da célula buliforme, utilizado o software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). Para padronização nas mensurações foi considerado somente as avaliações da maior célula buliforme de cada conjunto de células, conforme figura 10.

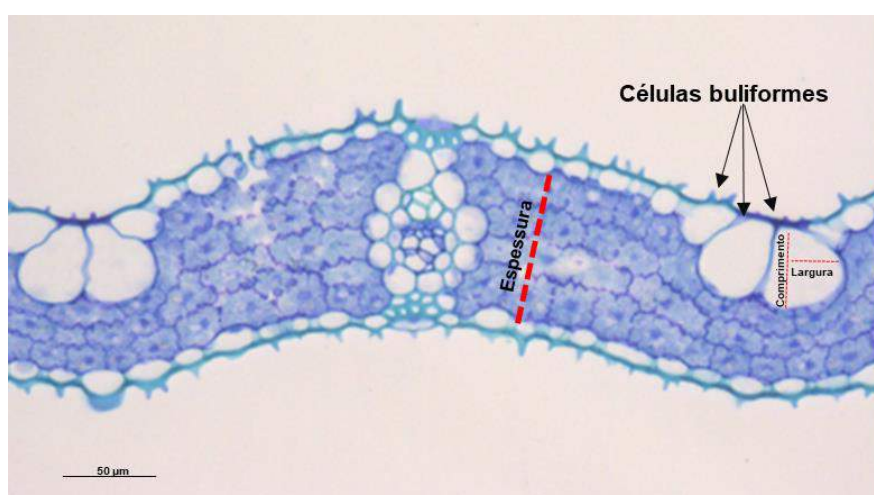


Figura 10. Corte transversal de folha de arroz demonstrado as mensurações da espessura do parênquima, do comprimento e da largura da maior célula buliforme no conjunto de células.

4.2.4 Inoculação do patógeno e avaliação dos componentes de resistência

A preservação do fungo, seu cultivo em meio artificial e o preparo de inoculo foi realizado conforme Dallagnol et al. (2009). A inoculação do *B. oryzae* em todas as folhas das plantas de arroz (estágio fenológico V₇-V₈, segundo escala de Counce, 2000) foi realizada por meio da pulverização da suspensão de esporos (1×10^4 conídios por mL⁻¹) com auxílio de atomizador manual (Tecblas, REF: 359 – 60 mL / Porto Alegre, Brasil). Imediatamente após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições de câmara úmida, com umidade relativa superior a 95%, com auxílio de umidificador (Soniclear®, Waterclear Max), durante 48h à 25 ± 2 °C. As plantas permaneceram dentro das respectivas OTCs durante as 48 horas de câmara úmida.

Aos três (3), oito (8) e dezesseis (16) dias após a inoculação (dai) foram avaliados o tamanho de lesão e a severidade da mancha parda. O tamanho de lesão (mm) foi realizado através da mensuração de cinco lesões, selecionadas aleatoriamente, na região central de duas folhas de uma planta por repetição, utilizando-se um paquímetro eletrônico digital. E a severidade, em porcentagem (%), da mancha parda foi estimada através do software para quantificação de doenças de plantas QUANT® (UFV, Brasil).

4.2.5 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Aos três (3), oito (8) e dezesseis (16) dai foi determinado os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a na primeira e segunda folha do colmo principal de plantas da cv. BRS Querência e Inov CL, cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm CO₂ atmosférico (700 ppm) as quais foram ou não inoculadas com *B. oryzae*.

Parâmetros de trocas de gasosas. As quantificações foram realizadas sob CO₂ ambiente (400 ± 1 mmol mol⁻¹) e condições de temperatura com luz artificial (1.200 mmol de ftons m⁻² s⁻¹ no nível da folha). A taxa fotossintética líquida (*A*), a condutância estomática de vapores de água (*gs*), a concentração interna de CO₂ (*C*) e a taxa transpiratória (*E*) foram medidas durante a manhã (8:30 h as 10:30 h) usando o analisador de gás infravermelho portátil (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Durante as medidas fotossintéticas, os valores

médios da temperatura do ar e da umidade relativa foram, 28 ± 2 °C e $68 \pm 2\%$, respectivamente. A eficiência da carboxilação (*EC*) e a eficiência do uso da água (*EUA*) foram calculadas como a razão de A / C_i e A / E , respectivamente.

A fluorescência transiente da clorofila a. As quantificações foram realizadas com fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments), nas mesmas folhas onde foi quantificada as trocas gasosas, na porção mediana de folhas previamente adaptadas ao escuro, com auxílio de “*leaf clips*”, por 30 minutos. As avaliações iniciaram por meio da emissão de um pulso de $1.500 \mu\text{mol}$ de ftons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 1s, na face abaxial da folha. As variáveis observadas nas medições da fluorescência da clorofila *a* foram o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), fluxo específico de energia dissipada (DI_0/RC), fluxo de transporte de elétrons por centro de reação no tempo zero (ET_0/RC) e rendimento quântico de transporte de elétrons (Φ_{E_0}) (Dallagnol et al 2015).

4.2.6 *Extração e quantificação de carboidratos em folhas de arroz*

A análise foi realizada utilizando todas as folhas do colmo principal de cada planta. As folhas foram amostradas às 12, 48 e 96 horas após a inoculação (hai). Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas usando nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C . Para cada tempo de amostragem foram utilizadas quatro repetições cada uma constituída por uma planta.

Os carboidratos foram extraídos de 0,1 g de amostras foliares de acordo com Bieleski;Turner (1966) com modificações.

A quantificação da concentração de açúcares solúveis totais (AST) foi realizada por meio da reação com antrona (0,15% em H_2SO_4 concentrado) (Grahmam;Smydzuk, 1965) baseada na absorbância a 620 nm e os resultados expressos em mg g^{-1} de matéria fresca (mf).

Para a sacarose também se utilizou o método da antrona, conforme descrito por Grahmam; Smydzuk (1965) com algumas modificações. As amostras foram incubadas em banho-maria por 10 minutos com hidróxido de potássio (KOH 30%) para a degradação dos carboidratos redutores. Em seguida, após as amostras serem resfriadas a temperatura ambiente, adicionou-se 3 mL de antrona (0,15% em H_2SO_4 concentrado) e novamente

foram incubadas em banho-maria a 40°C por 15 min. Após, absorvância foi medida em espectrofotômetro a 620 nm (marca Biospectro, modelo SP-22) e os resultados expressos em mg g⁻¹ mf.

Do resíduo proveniente da extração dos açúcares solúveis totais, foi realizada a extração do polissacarídeo e amido em ácido perclórico segundo McCready et al. (1960). A quantificação dos mesmos foi de acordo com o método utilizado para quantificação de açúcares solúveis totais, sendo o polissacarídeo expresso em mg g⁻¹ mf e o resultado do amido multiplicado pelo fator de correção 0,9 e expresso em mg g⁻¹ mf.

4.2.7 Análises dos dados

Para evidenciar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de *Shapiro Wilk*, para todas as variáveis realizadas nos experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Student (teste-*t*) no software SAS (SAS Institute, 1989, Cary, NC).

4.3 Resultados

4.3.1 Características anatômicas da lâmina foliar do arroz

O fator cultivar foi significativo para todas as mensurações, exceto para a largura da célula buliforme (Tabela. 8), independente da concentração do CO₂. A 400 ppm de CO₂, a cultivar BRS Querência apresentou espessura do parênquima e o comprimento da célula buliforme maiores em 5 e 14%, respectivamente, quando comparado a cultivar Inov CL (Tabela 8). Para as plantas de arroz, a 700 ppm de CO₂, a cultivar BRS Querência apresentou redução de 16% na espessura do parênquima em comparação a cultivar Inov CL (Tabela 8).

Tabela 8. Espessura do parênquima, comprimento e largura da célula buliforme em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ou 700 ppm de gás carbônico (CO₂).

Cultivares	Parênquima		Célula Buliforme			
	Espessura (µm)		Comprimento (µm)		Largura (µm)	
	Concentrações de CO ₂		Concentrações de CO ₂			
	400 ppm	700 ppm	400 ppm	700 ppm	400 ppm	700 ppm
BRS Querência	69,79 aA	54,95 bB	42,84 aA	36,54 aB	40,06 aA	33,59 aB
Inov CL	66,31 bA	65,23 aA	37,40 bA	36,14 aA	38,43 aA	35,93 aA
CV%	8,20		10,0		15,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste *t* ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. Letras maiúsculas na linha, compara as médias entre as concentrações de CO₂ pelo teste *t* ($p \leq 0,05$).

O fator CO₂ foi significativo de maneira geral para todos os parâmetros anatômicos avaliados, exceto na cultivar Inov CL, bem como as interações entre os fatores cultivar e CO₂ (Tabela 8). Plantas da cultivar BRS Querência cultivadas a 700 ppm apresentaram redução de 21% na espessura do parênquima, de 15% no comprimento e 16% na largura da célula buliforme, quando comparado a plantas cultivadas a 400 ppm (Tabela 8).

4.3.2 Componentes de resistência

O fator cultivar não foi significativo para os parâmetros avaliados, independente do período de avaliação (Tabela 9).

Tabela 9. Tamanho de lesão e severidade da mancha parda aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação do *Bipolaris oryzae* em plantas das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente enriquecido ou não com gás carbônico (CO₂).

Tratamentos	Dias após a inoculação					
	3 dai		8 dai		16 dai	
Cultivar	Tamanho de lesão (mm)	Severidade (%)	Tamanho de lesão (mm)	Severidade (%)	Tamanho de lesão (mm)	Severidade (%)
BRS Querência	1,03 a	3,63 a	1,19 a	7,03 a	1,64 a	10,50 a
Inov CL	0,97 a	2,85 a	1,11 a	6,71 a	1,49 a	9,41 a
CV%	7,94	22,46	9,46	11,29	11,40	18,54
CO ₂						
400 ppm	1,00 a	3,76 a	1,20 a	7,47 a	1,72 a	11,97 a
700 ppm	1,00 a	2,72 b	1,12 a	6,27 b	1,41 b	7,93 b
CV%	8,67	19,36	9,89	6,85	6,77	8,50

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar ou concentração de CO₂ pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

O fator concentração de CO₂ foi significativo para todos os parâmetros, exceto para o tamanho de lesão aos 3 e 8 dai, independente da cultivar (Tabela 9). Nas plantas à 700 ppm, a severidade da mancha parda foi menor em 27%, 16% e 33%, respectivamente, aos 3, 8 e 16 dai, quando comparadas com plantas cultivadas a 400 ppm (Tabela 9). O tamanho de lesão, nas plantas à 700 ppm, foi 18% menor aos 16 dai quando comparado as plantas a 400 ppm (Tabela 9).

4.3.3 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila

Para as variáveis de trocas gasosas, as cultivares de arroz não apresentaram diferença significativa (Figura 11a, d, g, j, m e p), exceto para a *EUA* aos 8 dai, a qual foi 40% maior na cultivar *Inov CL* do que a *BRS Querência* (Figura 11p).

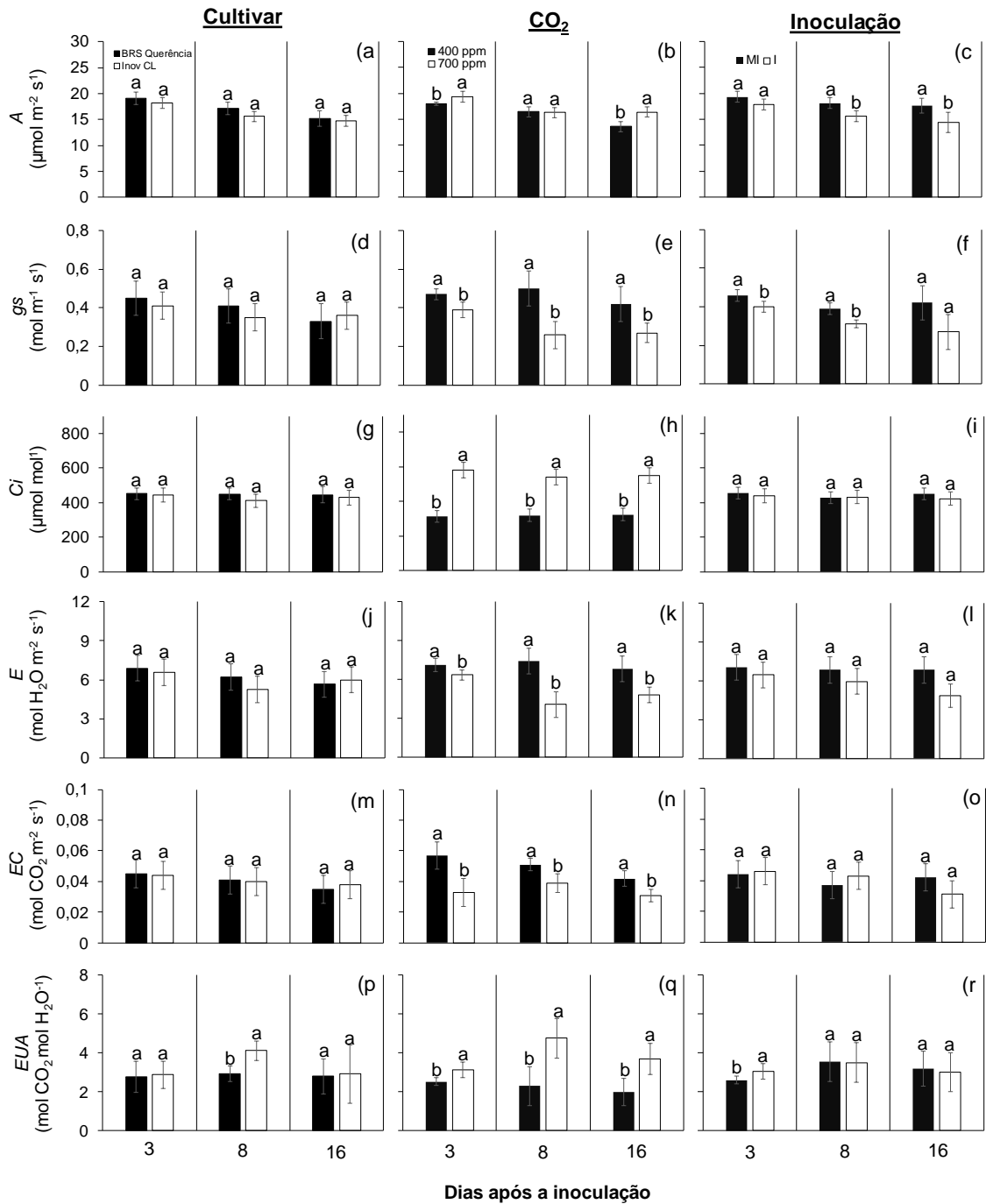


Figura 11. Taxa fotossintética (A), condutância estomática de vapores de água (gs), concentração interna de CO₂ (Ci), taxa transpiratória (E), eficiência da carboxilação (EC) e a eficiência do uso da água (EUA) aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

Em relação a concentração de CO₂ atmosférico, o seu efeito, foi significativo de maneira geral para todas as variáveis de trocas gasosas, independente do momento da avaliação (Figura 11b, e, h, k, n e q). A *A* aumentou em 8% e 20% no 3 e 16 dai, respectivamente em plantas a 700 ppm comparado a 400 ppm. As variáveis *gs*, *E* e *EC*, à 700 ppm, foram reduzidas do 3 até 16 DAI, em relação a plantas a 400 ppm. A redução, foi de 17, 48 e 36% para o *gs*, 10, 45, 29% para a *E* e 42, 23 e 26% para a *EC* (Figura 11e, k e n). Nas plantas à 700 ppm, o *Ci* aumentou em 85, 68 e 70%, e *EUA* aumentou 24, 100 e 85%, respectivamente aos 3, 8 e 16 dai, comparado com plantas cultivadas a 400 ppm (Figura 11).

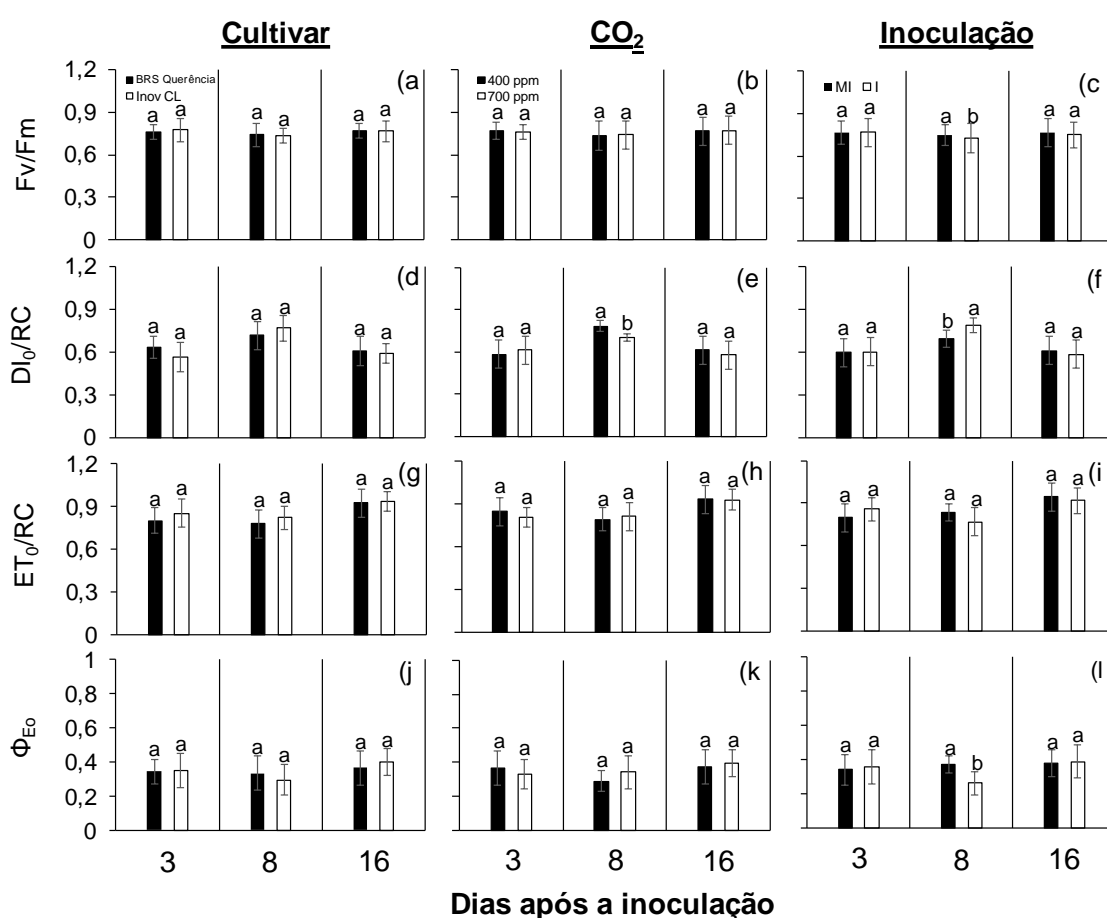


Figura 12. Rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), fluxo específico de energia dissipada (DI_0/RC), fluxo de transporte de elétrons por centro de reação no tempo zero (ET_0/RC) e rendimento quântico de transporte de elétrons (Φ_{Eo}) aos 3, 8 e 16 dias após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (NI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

Para o fator inoculação, nas plantas inoculadas com *B. oryzae*, a *A* reduziu 13 e 18%, respectivamente, aos 8 e 16 dai (Figura 11c), e a *gs* 13 e 23% aos 3 e 8 dai (Figura 11f), porém *EUA* aumentou 17% aos 3 dai (Figura 11r), quando comparado a plantas não inoculadas.

Para as variáveis de fluorescência da clorofila *a* as cultivares de arroz, não apresentaram diferença significativa (Figura 12a, d, g e j), independente do momento de avaliação.

Em relação a concentração de CO₂ atmosférico, o seu efeito, foi significativo para o *DI₀/RC* aos 8 dai. Plantas a 700 ppm apresentaram uma redução de 10% quando comparado a 400 ppm (Figura 12e).

Para o fator inoculação, plantas inoculadas com *B. oryzae*, apresentaram aumento no *DI₀/RC* de 14% (Figura 12f) e reduziram o *Fv/Fm* e Φ_{E0} em 3 e 29% (Figura 12c e Figura 12l), respectivamente aos 8 dai, quando comparado a plantas não inoculadas.

4.3.4 Açúcares

Não ocorreu interação entre os fatores cultivar, concentração de CO₂ e inoculação. O fator cultivar apresentou diferença significativa apenas as 48 hai para a concentração de polissacárido e amido (Figura 13g e j).

O fator CO₂ foi significativo para os açúcares solúveis totais, polissacarídeos e amido (Figura 13b, h e k). Plantas à 700 ppm, apresentaram aumento na concentração do amido das 48 hai até 96 hai de 28 e 36%, respectivamente, de polissacarídeos às 96 hai de 27% e para os açúcares solúveis totais às 12, 48 e 96 hai de 36, 49 e 44%, respectivamente, quando comparadas com plantas cultivadas a 400 ppm (Figura 13b).

Plantas inoculadas ou não com o patógeno, não apresentaram diferença significativa para os carboidratos, independente da cultivar ou concentração de CO₂ (Figura 13).

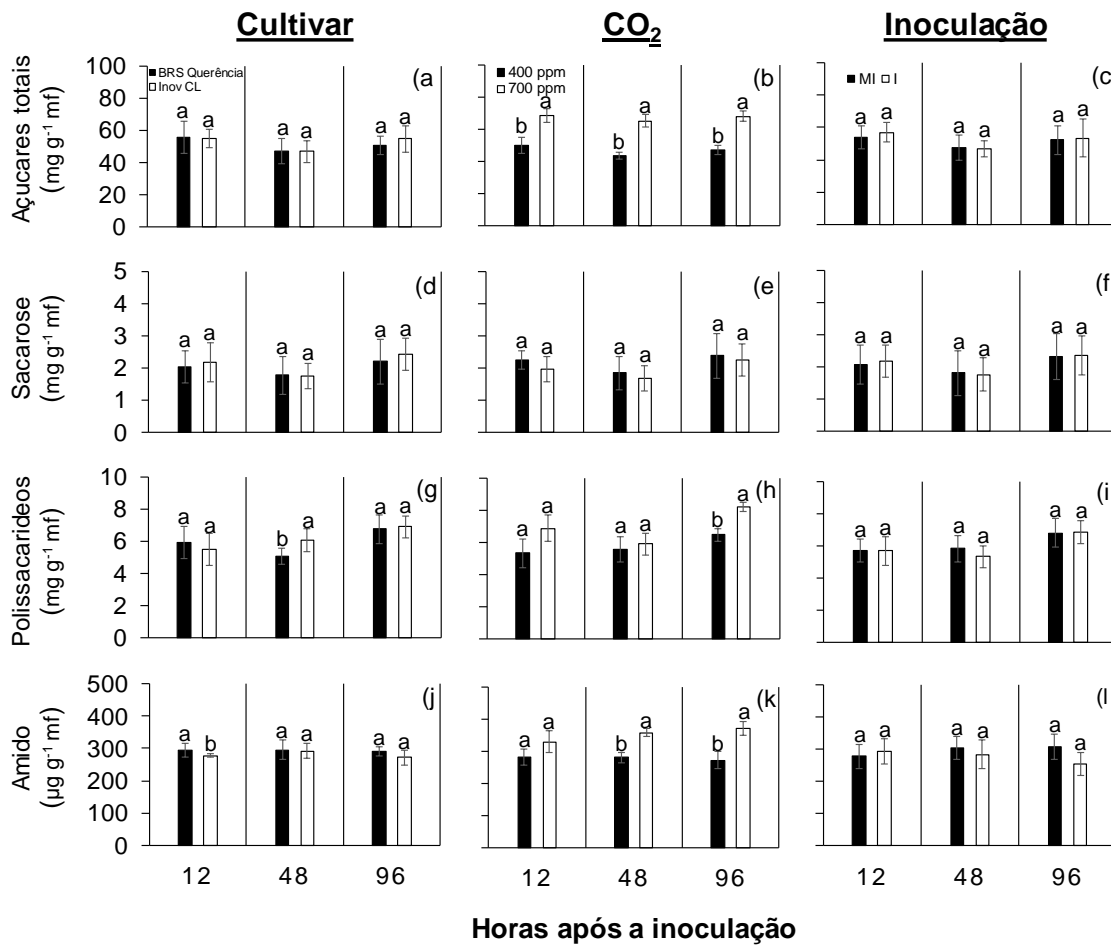


Figura 13. Concentração de açúcares totais, sacarose, polissacarídeos e amido as 12, 48 e 96 horas após a inoculação em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Inov CL cultivadas em ambiente com 400 ppm ou 700 ppm de CO₂ atmosférico e submetidas (I) ou não (MI) a inoculação com *Bipolaris oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cultivar, concentração de CO₂ e inoculação pelo teste de *t* ($p \leq 0,05$).

4.4 Discussão

As características anatômicas, fotossintéticas, a concentração de carboidratos e a severidade da mancha parda foram alterados em plantas de arroz cultivadas na concentração de 700 ppm de CO₂ atmosférico. A redução na espessura do parênquima e do tamanho das células buliformes e o aumento na concentração de carboidratos foram relacionados como a causa da mitigação da severidade da mancha parda, causada pelo *B. oryzae*, nas plantas de arroz a 700 ppm de CO₂.

O fungo *B. oryzae*, após a sua germinação na superfície do hospedeiro, penetra as células da epiderme, principalmente através das células buliformes, que são totalmente colonizadas pelo micélio do fungo, desenvolvendo-se posteriormente no meio intercelular do parênquima (TULLIS, 1935). A 700 ppm de CO₂, as células buliformes e o parênquima, apresentaram o seu tamanho e a espessura reduzidos. Alterações anatômicas resultantes da elevação do CO₂ atmosférico até 800 ppm, já foram constatadas para outras culturas como trigo e soja (PRITCHARD et al., 1999). No entanto, conforme Ferris et al. (1996) os efeitos da elevação do CO₂ na anatomia foliar, podem variar dependendo da fertilidade do solo, estação do ano, estágio fenológico e, sobretudo, entre cultivares. Essas informações suportam os resultados de deste estudo, no qual as características anatômicas resultantes da elevação do CO₂ foram mais proeminentes na cultivar BRS Querência suscetível à mancha parda, do que na cultivar Inov CL considerada resistente.

Ademais, estudos que buscam compreensão da relação entre anatomia foliar e as doenças, apontam que a densidade, compactação e espessura das células do parênquima de cultivares da mesma espécie podem apresentar resultados diferentes quanto à resistência aos microrganismos (ALQUINI et al., 2006). Em consenso, Tullius (1935) ao comparar a anatomia foliar de cultivares de arroz resistente e suscetível à mancha parda, constatou que os suscetíveis possuíam grandes espaços intercelulares e câmaras subestomáticas que facilitavam o desenvolvimento do patógeno. Análises histopatológicas do processo de infecção e colonização não foram realizadas neste estudo, contudo com base na literatura e nos resultados morfológicos podemos propor que a redução no tamanho e espessura das células buliformes e do parênquima, respectivamente, pelo aumento do CO₂ contribuíram no retardo da evolução da patogênese do *B. oryzae*, constatado pelo menor tamanho de lesão.

Esta hipótese é fundamentada por estudos que associam a densidade do parênquima à resistência a várias doenças foliares, pois, a disposição compacta das células dificulta a ação mecânica e acaba por inibir ou retardar invasão do agente patogênico. Além disso, a menor área intracelular, possibilita o acúmulo de substâncias envolvidas no reforçamento celular ou de ação direta ao patógeno, como: lignina, calose, silício e compostos de origem fenólica, de

maneira mais eficaz e frenética (Yang 2000; SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005). Plantas de *Eucalyptus nitens* que possuem folhas mais finas, demonstram maior resistência a *Mycosphaerella* sp., devido a planta ter a capacidade de formar a periderme necrofilática (células que sofrem adição de lignina, suberina e demais compostos a sua parede celular, e preenchendo espaços do parênquima de maneira a formar uma barreira para limitar o desenvolvimento do patógeno) de maneira mais rápida (SMITH et al., 2006).

Os fatores anatômicos além da função estrutural na planta desempenham inúmeras outras funções. Por exemplo, nas células do parênquima, encontra-se a maior parte do aparato para a fotossíntese e a fabricação e transporte de numerosos compostos químicos usados no metabolismo da planta. Contudo, o *B. oryzae* no seu intuito de extrair nutriente do tecido do hospedeiro, acaba por afetar a fisiologia da planta, por acometer esses compartimentos, impactando danos em etapas fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese, como: redução no rendimento quântico máximo do PSII, fluxo de transporte de elétrons e na taxa de assimilação do carbono, condutância estomática e transpiração (DALLAGNOL et al., 2015; PANDEY, 2018). De fato, neste estudo plantas inoculadas com o patógeno, apresentaram redução na A e g_s , bem como, alterações em variáveis referentes a fluorescência da clorofila a - F_v/F_m , Dl_0/RC e Φ_{E_0} , conforme ocorreu aumento da severidade da doença.

A causa desses distúrbios na planta é devido a ação das micotoxinas ofiobolinas A e B que atuam principalmente nos fotossistemas, através do acúmulo de compostos reativos, que se tornam tóxicos e provocam a foto-oxidação da clorofila e a ocorrência da morte celular (SUNDER, 2014; CHOWDHURY et al., 2017). Estudo já demonstrou que os danos em pigmentos foram atenuados em plantas de arroz a 700 ppm de CO_2 as quais apresentaram maior concentração da clorofila total, a e b e carotenoides devido a mitigação dos danos celulares causados pelo *B. oryzae* (Dados não mostrados).

Para uma melhor compreensão do efeito do estresse na fisiologia da planta, a relação F_v/F_m é uma variável cada vez mais explorada em estudos fitopatológicos, devido ser uma indicadora de estresse fisiológico. Isto porque, está variável, representa a capacidade da planta para converter energia do

fóton em energia química. Plantas que apresentam o seu aparelho fotossintético intacto, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,75 e 0,85, entretanto em plantas sobre condições de estresse, essa razão diminuiu acentuadamente, devido a presença de dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII, levando a queda da taxa fotossintética (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989).

Nesse estudo, mesmo havendo uma taxa decrescente da fotossíntese, conforme o progresso da doença, o mesmo não foi observado para o F_v/F_m , podendo estar relacionado com a severidade da doença que não foi tão expressiva no período de avaliação. Segundo Heuer (1997) as alterações na relação F_v/F_m geralmente são percebidas quando o estresse é muito severo ou em estresse de média e longa duração.

Em contrapartida, a elevação do CO_2 aumentou a A , C_i e a EUA e reduziu a E . Resultados semelhantes vêm sendo relatados para uma gama de espécies, incluindo arroz, onde altas concentrações de CO_2 mostram ter influência positiva na fotossíntese, elevando a sua taxa líquida, conseqüentemente originando e potencializando o acúmulo de substâncias ricas em energias (MISRA; CHEN, 2015). As alterações químicas, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem nas plantas são proporcionadas pela elevação do CO_2 atmosférico, que, por conseqüência, aumenta a produção e acúmulo de compostos - tanto do metabolismo primário, como secundário - e tem como foco principal a geração de biomassa e incremento na produção (MIKKELSEN et al., 2015). Contudo, estes compostos, também são associados com a defesa da planta contra patógenos, como, por exemplo, os açúcares.

Os açúcares promovem o acúmulo de peróxido de hidrogênio, nas fases iniciais da infecção, a expressão de PR proteínas e atuam como moléculas *priming*, ativando a cascata de sinalizações, fitohormônios, reforçamento de parede celular e vias de sinalização celular (MORKUNAS; RATAJCZAK, 2014). Sumarizando essas informações, inferimos que o aumento na concentração de açúcares nas plantas de arroz influenciou na redução da severidade da mancha parda. Estudo realizado por Dallagnol et al. (2013) constatou que o aumento na concentração de açúcares no arroz foi desfavorável para o progresso da mancha parda.

Saliente-se ainda, que o aumento na concentração de polissacarídeos de reserva energética, como, o amido em condições de CO₂ elevado, possibilita para a planta a capacidade de atenuar os efeitos deletérios causados pelo patógeno no seu tecido foliar, aumentando a síntese de moléculas ou estimulando a emissões de folhas novas, que auxiliarão na captação de energia luminosa para geração de energia química. Em tomate, por exemplo, o ganho de biomassa foliar e radicular quando cultivados a 700 ppm de CO₂, demonstrou compensar os danos no sistema radicular causado pela *Phytophthora parasítica*, proporcionando uma tolerância das plantas a doença (JWA; WALLING, 2001).

Ademais, assim como já havia sido parcialmente explanado, pesquisas mais detalhadas, principalmente em *Arabidopsis*, têm demonstrado que a elevação do CO₂ na atmosfera, é capaz de promover alterações no sistema imune das espécies cultivadas, atenuando os efeitos dos mais variados tipos de estresse presente no ambiente (MHAMDI; NOCTOR, 2016). As alterações partem da estimulação de múltiplas vias de defesa, desde a expressão de genes, regulação hormonal, homeostase celular, acúmulo de substâncias fenólicas, atividade de enzimas e do seu potencial redox (NOCTOR; MHAMDI, 2017; VELÁSQUEZ et al., 2018; WILLIAMS et al., 2018).

Em conclusão, os dados deste estudo indicam que a redução na espessura do parênquima e do tamanho das células buliformes e o aumento na concentração de carboidratos estão relacionados como a causa da mitigação da severidade da mancha parda, causada pelo *B. oryzae* nas plantas de arroz quando cultivadas a 700 ppm de CO₂. Embora, a resistência a mancha parda seja resultante de uma combinação de várias vias, as informações geradas nesse estudo, tornam-se mais uma peça, que complementa o quebra cabeça da interação planta-patógeno, relacionado ao patossistema *B. oryzae*, em simulação de condições climáticas futuras.

5 Conclusões gerais

A elevação da concentração de CO₂ atmosférica, de 400 ppm para 700 ppm, causa alterações no comportamento epidemiológico de doenças do arroz variável com a forma de parasitismo do patógeno.

A concentração de 700 ppm de CO₂ proporciona em cultivares de arroz atenuação de danos oxidativos e da severidade da mancha parda, causada pelo *B. oryzae*, por meio da potencialização na atividade de enzimas antioxidantes e acúmulo de compostos fenólicos e lignina.

A redução na espessura do parênquima e do tamanho das células buliformes e o aumento na concentração de carboidratos foram relacionados como a causa da mitigação da severidade da mancha parda, causada pelo *B. oryzae*, nas plantas de arroz quando cultivadas a 700 ppm de CO₂.

6 Referências

- ABDELGAWAD, H.; ZINTA, G.; BEEMSTER, G. T.; JANSSENS, I. A.; ASARD, H. Future climate CO₂ levels mitigate stress impact on plants: Increased defense or decreased challenge?. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 2, p.556, 2016.
- AGÜERA, E.; DE LA HABA. Leaf senescence in response to elevated atmospheric CO₂ concentration and low nitrogen supply. **Biologia Plantarum**, v. 62, n. 3, p. 401–408, 2018.
- ALQUINI, Y.; BONA, C., BOEGER, M. R. T; BARROS, C. F. Epiderme. In APEZATTO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Eds). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV. p. 87-108, 2006.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- 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.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BISWAS, M. K.; QUIRY, S.; GHOSH, T. Role of abiotic factors on the development of rice brown spot caused by *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker. **Bionature**, v. 38, n. 2, p. 86-96, 2018.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P., BAKER, N. R., et al. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, v. 3, p. 497-514, 1989.
- BORDIN, L. C. et al. Efeito da aplicação de fungicidas no controle de doenças foliares de arroz irrigado e sua relação com o rendimento industrial. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 85-88. 2016.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CHAKRABORTY, S. Potential impact of climate change on plant-pathogen interactions. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 443-448, 2005.
- CHAKRABORTY, S.; LUCK, J.; HOLLAWAY, G.; FREEMAN, A.; NORTON, R.; GARRETT, K. A.; PERCY, K.; HOPKINS, A.; DAVIS, C.; KARNOSKY, D. F. Impacts of global change on diseases of agricultural crops and forest trees. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, p. 1-15, 2008.

CHAKRABORTY, S.; MURRAY, G.; WHITE, N. Impact of climate change on important plant diseases in Australia. **Rural Industries Research and Development Corporation**, W02/010, 2002.

CHAKRABORTY, S.; NEWTON, A.C. Climate change, plant diseases and food security: **An overview. Plant Pathology**, v.60, p.2-14, 2011.

CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17251, 2017.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do arroz**. Brasília: Conab, 2018, 218 p.

COUNCE, P. A. et al. A Uniform and adaptative system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, p. 436-443, 2000.

DALLAGNOL L. J. et al. Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicon uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. **Plant Pathology**, v. 62, p. 120-129, 2013.

DALLAGNOL, L. J. et al. Comparison of root versus foliar applied potassium silicate in potentiating post infection defences of melon against powdery mildew. **Plant Pathology**, v. 64, n. 5, p. 1085-1093, 2015.

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.

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

DALLAGNOL, L. J. et al. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p. 92-104, 2011.

DALLAGNOL, L. J.; MARTINS, S. C. V.; DAMATTA, F. M.; RODRIGUES, F. Á. Brown spot negatively affects gas exchange and chlorophyll a fluorescence in rice leaves. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 275-278, 2015.

DATNOFF, L. E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and plant nutrition. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (Ed.). **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2007. p. 233-246.

DELCOUR, I. et al., Literature review: Impact of climate change on pesticide use. **Food Research International**, v. 68, p.7-15, 2015.

DORNELES, K. R.; DALLAGNOL, L. J.; PAZDIORA, P. C.; RODRIGUES, F. A.; DEUNER, S. Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 97, p. 69-78, 2017.

DORNELES, K R; DALLAGNOL, L J; PAZDIORA, P C; HOFFMANN, J F; CHAVES, F C; MONTE, L G; RODRIGUES, F A. Wheat leaf resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* induced by silicon activation of phenylpropanoid metabolism. **Plant Pathology**. v. 67, n. 8, p. 1713-1724, 2018.

EASTBURN, D. M.; MCELDRONE, A. J.; BILGIN, D. D. Influence of atmospheric and climatic change on plant-pathogen interactions. **Plant Pathology**, v.60, p.54-69, 2011.

FERRIS, R.; NIJS, I.; BEHAECHE, T.; IMPENS, I. Elevated CO₂ and temperature have different effects on leaf anatomy of perennial ryegrass in spring and summer. **Annals of Botany**, v. 78, p.489–497, 1996.

GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005.

GILARDI, G.; GISI, U.; GARIBALDI, A.; GULLINO, G. M. Effect of elevated atmospheric CO₂ and temperature on the chemical and biological control of powdery mildew of zucchini and the phoma leaf spot of leaf beet. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 148, p. 229-236, 2017.

GÓRIA, M. M.; GHINI, R.; BETTIOL, W. Elevated atmospheric CO₂ concentration increases rice blast severity. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 253-257, 2013.

GOUFO, P. et al. Rice (*Oryza sativa* L.) phenolic compounds under elevated carbon dioxide (CO₂) concentration. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 28-37, 2014.

GRAHAM, D.; SMYDZUC, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 246-255, 1965.

GULART, C.; MANTELLI, J.; DEBORTOLI, M. P.; MADALOSSO, M. G. *Drechslera gigantea* (*Pyrenophora gigantea*), agente causal da mancha zonada, em lavouras de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Phytus Técnica**, 7ª Edição, Santa Maria, RS. 2015. 4 p.

HEUER, B. Photosynthetic carbon metabolism of crops under salt stress. In: Pessarakli, M. (ed.). **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. p. 887-896.

HIBBERD, J. M.; WHITBREAD, R.; FARRAR, J. F. Effect of 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ and infection with powdery mildew on the growth and carbon partitioning of barley. **New Phytologist**, v. 134, p. 309-315, 1996.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE-IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, p.151, 2014

JAUREGUI, I.; APARICIO-TEJO, P. M.; AVILA, C.; RUEDA-LÓPEZ, M.; ARANJUELO, I. Root and shoot performance of *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated CO₂: a physiologic, metabolic and transcriptomic response. **Journal of Plant Physiology**, v. 189, p. 65–76, 2015.

JWA, N. S.; WALLING, L. L. Influence of elevated CO₂ concentration on disease development in tomato. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 509-518, 2001.

KARAMIAN, F.; NEZHAD, A. H.; ZAEIM, A. N.; MORADI, K.; DRAKSHAN, A. H. Blast Disease in Rice: A Review. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**. v. 1, n.5, p. 228-232, 2015.

KARKI, S.; RIZAL, G.; QUICK, W. P. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. **The Rice Journal**, v. 28, n. 6, 2013.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KOBAYASHI, T. et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the infection of rice blast and sheath blight. **Phytopathology**, v. 96, p. 425–431, 2006.

KUMARI, S.; AGRAWAL, M.; TIWARI, S. Impact of elevated CO₂ and elevated O₃ on *Beta vulgaris* L.: pigments, metabolites, antioxidants, growth and yield. **Environmental Pollution**, v.174, p. 279–288, 2013.

LESSIN, R. C.; GHINI, R. Effect of increased atmospheric CO₂ concentration on powdery mildew and growth of soybean plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 385-392, 2009.

LETCHER, T. **Climate change: observed impacts on planet Earth**. Amsterdam: Elsevier, 2009. cap. 25, p. 425-437.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.47, p.239-247. 2002.

LUCK, J. et al. Climate change and diseases of food crops. **Plant Pathology**. v.60, p.113-121, 2011.

McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; applications to peãs. **Analytical Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1960.

MENGISTE, T. Plant Immunity to necrotrophs. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 267-294, 2012.

MHAMDI, A.; NOCTOR G. High CO₂ primes plant biotic stress defences through redox-linked pathways. **Plant Physiology**, v. 172, p. 929–942, 2016.

MIKKELSEN, B. L.; OLSEN, C. E.; LYNGKJÆR M. F. Accumulation of secondary metabolites in healthy and diseased barley, grown under future climate levels of CO₂, ozone and temperature, **Phytochemistry**, v. 118, p. 162-173, 2015.

MISRA, B. B.; CHEN, S. Advances in understanding CO₂ responsive plant metabolomes in the era of climate change. **Metabolomics**, v. 11, p. 1478–1491, 2015.

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

MOHAMMAD, R. B. M.; WIM, V. E. Sugars and plant innate immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 3989- 3998, 2012.

MORKUNAS, I.; RATAJCZAK, L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 1607–1619, 2014.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A. Climate change, CO₂, and defense: The Metabolic, redox, and signaling perspectives. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 10, p. 857-870, 2017.

NUNES, C. D. M. Ocorrência das doenças: mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis*) e mancha-parda (*Drechslera* sp.) na cultura do arroz. Embrapa Clima Temperado. **Comunicado técnico**, 2008.

PANDEY, S. Physiological and biochemical changes associated with the development of brown spot diseases in rice leaves. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 4, p. 69-78, 2018.

PERCICH, J. A.; NYVALL, R. F.; MALVICK, D.K.; KOHLS, C. L. Interaction of temperature and moisture on infection of wild rice by *Bipolaris oryzae* in the growth chamber. **Plant Disease**, v. 81, p. 1193 – 1195, 1997.

PLESSL, M.; ELSTNER, E.F.; RENNENBERG, H.; HABERMEYER, J.; HEISER, I. Influence of elevated CO₂ and ozone concentrations on late blight resistance and growth of potato plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 447-457, 2007.

PRABHU, A.S.; SANTOS, A.B.; DIDONET, A.D. Soluble tissue sugar content and leaf blast severity in response to the application of calcinated serpentinite as a silicon source in irrigated rice. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 402-404, 2007.

PRASANNATH, K. Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. **AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences**, v. 11, n.1, p.38–48, 2017.

PRITCHARD, S. G.; ROGERS, H. H.; PRIOR, S. A.; PETERSON, C. M. Elevated CO₂ and plant structure: a review. **Global Change Biology**, v. 5, p. 807-837, 1999.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SHEEHY J.E.; MITCHELL P.L. Rice and global food security: the race between scientific discovery and catastrophe. In: Pasternak C. **The Search for Better Nutrition**, Smith-Gordon: Cambridgeshire. p. 81-90, 2011

SHERF, A. F.; PAGE, R. M.; TULLIS, E. C.; MORGAN, T. L. Studies on factors affecting the infectivity of *Helminthosporium oryzae*. **Phytopathology**, v. 37, p. 281–290, 1947.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SMITH, A.H., PINKARD, E. A., HUNTER, G.C. et al. Anatomical variation and defence responses of juvenile Eucalyptus nitens leaves to Mycosphaerella leaf disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p 725–731, 2006

SOARES, A. A. et al. Desempenho de linhagens de arroz de terras altas quanto à produtividade de grãos e outras características em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 50, p. 509-525, 2003.

SOSBAI. **Arroz irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Pelotas: SOSBAI, 2016. 200 p.

STEFANELLO, J. et al. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, p.476-481, 2012.

SUNDER, S. et al. Brown spot of rice: an overview. **Indian Phytopathology**, v. 67, n. 3, p. 201-215, 2014.

TAYLOR, G. et al. Future atmospheric CO₂ leads to delayed autumnal senescence. **Global Change Biology**, v.14, p. 264-275, 2008.

TULLIS, E. C. Histological studies of rice leaves infected with *Helminthosporium oryzae*. **Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 82-90, 1935.

VANDEGEER, R. K.; POWELL, K. S.; TAUSZ, M. Barley yellow dwarf virus infection and elevated CO₂ alter the antioxidants ascorbate and glutathione in wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, n. 20, p. 96-99, 2016.

VELÁSQUEZ, C. A.; DANVE, C. CASTROVERDE, M.; HE, Y. S. Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. **Current Biology**, v. 28, p. 619-634, 2018.

WILLIAMS, A. et al. Mechanisms of glacial-to-future atmospheric CO₂ effects on plant immunity. **New Phytologist**, DOI: 10.1111/nph.15018, 2018.

XIAO, J. Z. et al. Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. **Phytopathology**, v. 81, p. 58-64, 1991.

XU, Z.; JIANG, Y.; ZHOU, G. Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 701, 2015.

YANG, Q. Germplasm evaluation, inheritance, molecular marker and mechanism of resistance to Frog-eye leaf spot. **Journal of the North eastern Agricultural University**, v. 7, p. 1-6, 2000.

ZAVALA, J.A. et al. Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 5129-5133, 2008.

ZEMOLIN, C. R. et al. *Tilletia barclayana*: biologia e manejo em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1595-1600, 2009.

YIFEI, Z.; YANG, D.; GUIJUN, W.; BIN, L.; GUANGNAN, X.; FAJUN, C. Effects of elevated CO₂ on plant chemistry, growth, yield of resistant soybean, and feeding of a target Lepidoptera pest, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 47, n. 4, p. 848-856, 2018.

ZHANG, Y. et al. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 1, p. 23-35, 2013.

ZHOU, Y. **Modulation of plant immunity by atmospheric CO₂**. 2016. 122f. Thesis (Doctorate in Plant-Microbe Interactions) - Utrecht University, Utrecht, Netherlands.

ZHU, C. et al. Biochemical and molecular characteristics of leaf photosynthesis and relative seed yield of two contrasting rice cultivars in response to elevated (CO₂). **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p.6049-6056. 2014.

VITA

Keilor da Rosa Dorneles é filho de Ramona da Rosa Dorneles e Luiz Braga Dorneles, nascido em 14 de dezembro de 1990, no município de Itaqui, Rio Grande do Sul. No ano de 2008 ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Federal do Pampa - Unipampa, onde recebeu o título de Engenheiro Agrônomo em 2013. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do Laboratório de Microbiologia do solo sob orientação da Professora Doutora Luciana Zago Ethur. Em 2013, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, em Pelotas/RS, sob orientação do Professor Doutor Leandro José Dallagnol, onde recebeu o título de Mestre em Fitossanidade, com ênfase em Fitopatologia em 2015. No mesmo ano, ingressou como doutorando em fitopatologia no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Tendo como projeto de pesquisa a investigação do efeito da elevação da concentração de CO₂ atmosférico sobre as doenças que acometem a cultura do arroz.