

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Bioquímica e fisiologia da soja em ambiente protegido sob variações de
déficit hídrico, xenobiótico e bioestimulante**

Julia Renata Schneider

Passo Fundo

2019

Julia Renata Schneider

Bioquímica e fisiologia da soja em ambiente protegido sob variações de déficit hídrico,
xenobiótico e bioestimulante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Agronomia.

Orientador:
Prof. Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

S359b Schneider, Julia Renata
Bioquímica e fisiologia da soja em ambiente protegido sob
variações de déficit hídrico, xenobiótico e bioestimulante /
Julia Renata Schneider. – 2019.
91 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas
Junior

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2019.

1. Soja. 2. Plantas – Efeito dos fungicidas. 3.
Antioxidantes. I. Lamas Junior, Geraldo Luiz Chavarria,
orientador. II. Título.

CDU: 633.34

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Bioquímica e fisiologia da soja em ambiente protegido sob variações de déficit hídrico, xenobiótico e bioestimulante ”

Elaborada por

Julia Renata Schneider

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 05/04/2019
Pela Comissão Examinadora

Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador

Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

Dr. Luciano de Oliveira Siqueira
UPF

Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor FAMV

Dr. Genei Antonio Dalmago
Embrapa Trigo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jurema e Ronaldo. Eles são o sentido da minha existência, e todas as conquistas são por eles. Minha base, meus exemplos, meu TUDO. Serei eternamente grata a tudo que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, pela proteção e por me proporcionar muitas coisas boas, especialmente por me presentear com uma família maravilhosa e iluminada.

Aos meus pais, Jurema e Ronaldo por terem me ensinado o que é certo, a ter caráter e honestidade acima de tudo, por mostrarem que ser humilde é grandioso, por me darem muito amor e por sempre terem investido na minha educação. Por nunca se cansarem de ensinar, acreditar em mim e sempre estarem do meu lado em qualquer que fosse a situação.

Ao meu irmão Renan, pelas muitas puxadas de orelha, e pelos inúmeros conselhos e recomendações de alguém que já tinha passado por várias ocasiões semelhantes e que portanto sabia me dizer por onde é que eu deveria andar. Pelo incentivo e estímulos que sempre me deu, pelo respeito e companheirismo comigo.

Ao meu namorado Tiago, que é meu companheiro e é quem passou a maior parte do tempo ao meu lado durante esses dois anos. Nunca se cansou de afagar minha cabeça em dias difíceis, e sempre estava ali me dizendo que eu era capaz, que eu conseguiria e que no final iria dar tudo certo. Que viveu comigo muitas preocupações, alegrias e conquistas.

A minha cunhada Fernanda, pelas vivências, risadas, e por todas as energias positivas que trouxe para a nossa família, pela tranquilidade e paz que emana. E também por trazer agora um presentão para todos, que já é muito amada, nossa Catharina.

A todos os demais familiares, pelo apoio incondicional de sempre. Um agradecimento especial ao Jardel e a Lucécia, pelo convite de apadrinhar a pequena Martina, uma afilhada linda e cheia de luz.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGAgro), e a Universidade de Passo Fundo (UPF), pela oportunidade, pela estrutura, pela qualidade, pelos professores, funcionários, colegas, e tudo que me proporcionou. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, a qual possibilitou a realização deste trabalho e meus estudos.

Ao professor Dr. Geraldo Chavarria, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pela orientação, confiança, pelos conhecimentos que compartilha, pelos ensinamentos diários, e por reativar em mim a paixão pela pesquisa, mostrar o quanto ela é bela e satisfatória. Pelas excelentes ideias para condução de experimentos, e pelas ótimas sugestões e colaborações na elaboração desta dissertação.

Ao professor Dr. Vilson Klein e toda a equipe do laboratório, especialmente a Manuelli Zulpo, que sempre foi uma amiga muito querida e acolhedora, pela ajuda na realização e interpretação das análises. Aos professores Dra. Luciana Grando e Dr. Rômulo Barcelos, e em nome deles a todos os alunos envolvidos, pela ajuda nas análises bioquímicas, pela permissão na utilização de equipamentos, reagentes e laboratórios, e também pelo auxílio nos cálculos. A Dra. Andréia Caverzan, pelos ensinamentos durante esse período.

As colegas da pós, em especial, a Vanessa Dal'Maso, a Ana Rockenbach e a Mariele Müller, que muito mais que colegas, sempre foram amigas, dividindo as preocupações, auxiliando sempre que era necessário, dando sugestões e contribuições. As colegas de laboratório Cleisla Molin e Renata Toledo pela recepção, acolhimento, ajudas, amizade e as boas conversas.

Aos professores do programa por todos os ensinamentos nesse período, as secretárias da pós e também do curso da agronomia pelas inúmeras ajudas e dicas, mas também pela amizade. Aos demais funcionários pela manutenção e limpeza de toda a infraestrutura utilizada.

EPIGRAFE

“Lembre-se da sabedoria da água: ela nunca discute com um obstáculo, simplesmente o contorna.”

Augusto Cury

RESUMO

SCHNEIDER, Julia Renata. **Bioquímica e fisiologia da soja em ambiente protegido sob variações de déficit hídrico, xenobiótico e bioestimulante**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Estresse por déficit hídrico é o de principal ocorrência e que mais afeta o desenvolvimento das plantas. A aplicação de fungicida protege as plantas, mas pode acarretar em estresse oxidativo por ser um xenobiótico, composto estranho à planta. Em condições de campo, as plantas estão expostas a combinações de estresses bióticos e abióticos, como pode ser o caso do déficit hídrico combinado com a aplicação de fungicida. O desafio da pesquisa científica é caracterizar estes processos e criar estratégias de manejo para mitigar o efeito metabólico e econômico. Ainda, para minimizar os impactos destes estresses, vem se destacando o uso de produtos bioestimulantes, que atuam induzindo as defesas das plantas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos interativos na bioquímica e fisiologia de plantas de soja submetidas simultaneamente à aplicação de fungicida e a condições de déficit hídrico, e a possível atenuação de danos às plantas pela aplicação de bioestimulante, em ambiente protegido. Foram avaliadas alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de soja submetidas a restrição de água durante oito, seis, quatro e dois dias sem irrigação (oito potenciais da água do solo diferentes: -0,2286; -0,0332; -0,0245; -0,0164; -0,0074; -0,0029; -0,0018; -0,0008 MPa), aplicação de xenobiótico e bioestimulante. Sintomas visuais foram observados com relação à redução na turgescência das plantas sob restrição de água. Também sob baixa disponibilidade de água, o *status* hídrico foi prejudicado, assim como diminuída a troca de gases, os pigmentos fotossintéticos e o rendimento quântico do fotossistema II, e aumentada a temperatura foliar. A produção de peróxido de hidrogênio aumentou sob estresse de déficit hídrico, e a detecção *in situ* dessa espécie reativa mostrou alta eficiência do bioestimulante na sua eliminação. Isso foi comprovado pela avaliação da concentração do peróxido de hidrogênio nas células, a qual diminuiu pela aplicação de bioestimulante, assim como o superóxido. Danos de membrana de quase 70% foram observados para as plantas sob menor disponibilidade de água. A peroxidação lipídica foi aumentada em plantas sob baixos potenciais da água e sob aplicação de xenobiótico. A glutatona, componente do metabolismo antioxidante não enzimático, também foi aumentada nos menores potenciais da água do solo. Assim, é possível concluir que o déficit hídrico induziu ao estresse oxidativo, pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, danos celulares e moleculares, indução do metabolismo de defesa antioxidante, diminuição da troca de gases, do *status* hídrico e da eficiência fotossintética. A aplicação de xenobiótico também causou alterações, mas com menor intensidade. Efeitos deletérios às células foram mais pronunciados quando a aplicação ocorreu nas plantas submetidas à condição de baixa disponibilidade de água do solo. Isso indica diferentes respostas para a combinação de estresses. A aplicação de bioestimulante amenizou os efeitos do déficit hídrico e do xenobiótico. Algumas situações mostraram que o xenobiótico pode influenciar a ação do bioestimulante se aplicados concomitantemente.

Palavras-chave: 1. Disponibilidade hídrica. 2. Fungicida. 3. Metabolismo antioxidante. 4. Danos moleculares e celulares. 5. Manejo.

ABSTRACT

SCHNEIDER, Julia Renata. **Soybean biochemistry and physiology in protected environment under variations of water deficit, xenobiotic and biostimulant**. 91 f. Dissertation (Master in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Water deficit stress is the one of main occurrence and the one that most affects plant development. Fungicide application protects plants, but can lead to oxidative stress because it is a xenobiotic, compound strange to the plant. Under field conditions, plants are exposed to combinations of biotic and abiotic stresses, such as combined deficit water and fungicide application. The challenge of scientific research is characterize these processes and create management strategies to mitigate metabolic and economic effects. Also, to minimize the impacts of these stresses has been highlighted the use of biostimulant products, which act to induce plant defenses. Thus, the objective of this study is to evaluate the interactive effects on the biochemistry and physiology of soybean plants submitted simultaneously to fungicide application and water deficit conditions, and the possible attenuation of plant damage by the biostimulant application, in a controlled environment. Biochemical and physiological changes were evaluated in soybean plants submitted to eight, six, four and two days without irrigation (eight different soil water potentials: -0.2286, -0.0332, -0.0245, -0.0164, -0.0074, -0.0029, -0.0018, and -0.0008 MPa), xenobiotic and biostimulant applications. Visual symptoms showed that under water deficit plants were wilted. Also, under low water availability, was reduced water status, gas exchange, photosynthetic pigments, quantum yield of photosystem II, and increased leaf temperature. Hydrogen peroxide production was increased under deficit water stress and in situ detection of this specie showed high efficiency of biostimulant in its elimination. This was evidenced by the concentration evaluation of the hydrogen peroxide in cells, which decreased by biostimulant application, as well as superoxide. Nearly 70% of membrane damage was observed for plants with less water availability. Lipid peroxidation was increased in plants under low water potentials and under xenobiotic application. Glutathione, component of the metabolism antioxidant non-enzymatic, was also increased in lowest potentials of soil water. Thus, it is possible to conclude that water deficit induced oxidative stress, by the increased production of reactive oxygen species, cellular and molecular damage, and induction of antioxidant defense metabolism, reduction of gas exchange, water status and photosynthetic efficiency. Xenobiotic application also caused changes, but with less intensity. Deleterious effects on the cells were more pronounced when application occurred in plants submitted to low availability of soil water. This indicates different responses to the combination of stresses. The biostimulant application attenuated the effects of water deficit and xenobiotic. Some situations have shown that the xenobiotic can influence the biostimulant action, if applied concomitantly.

Key words: 1. Water availability. 2. Fungicide. 3. Antioxidant metabolism. 4. Molecular and cellular damage. 5. Management.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	<i>Déficit hídrico</i>	15
2.2	<i>Xenobiótico</i>	16
2.3	<i>Bioestimulantes</i>	17
2.4	<i>Estresses combinados</i>	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	<i>Sujeito da pesquisa e local do experimento</i>	20
3.2	<i>Delineamento experimental e tratamentos</i>	21
3.3	<i>Procedimentos</i>	21
3.3.1	<i>Status hídrico da planta</i>	22
3.3.2	<i>Temperatura da folha</i>	23
3.3.3	<i>Pigmentos fotossintéticos</i>	23
3.3.4	<i>Rendimento quântico do fotossistema II e fluorescência total da clorofila</i>	23
3.3.5	<i>Extração enzimática</i>	24
3.3.6	<i>Proteína</i>	24
3.3.7	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>	24
3.3.8	<i>Danos oxidativos</i>	25
3.3.9	<i>Enzimas antioxidantes</i>	26
3.3.10	<i>Antioxidantes não enzimáticos</i>	28
3.4	<i>Análise estatística</i>	28
4	RESULTADOS	29
4.1	<i>Sintomas visuais na turgescência</i>	29
4.2	<i>Status hídrico da planta</i>	30
4.2.1	<i>Potencial da água da folha</i>	30
4.2.2	<i>Conteúdo relativo de água</i>	31
4.2.3	<i>Condutância estomática</i>	31
4.3	<i>Temperatura da folha</i>	32
4.4	<i>Pigmentos fotossintéticos</i>	33
4.5	<i>Rendimento quântico do FSII e fluorescência total da clorofila</i>	35
4.6	<i>Espécies reativas de oxigênio: Superóxido e peróxido de hidrogênio</i>	37

<i>4.7 Dano de membrana</i>	41
<i>4.8 Malondialdeído</i>	42
<i>4.9 Superóxido dismutase</i>	43
<i>4.10 Catalase</i>	43
<i>4.11 Ascorbato peroxidase</i>	44
<i>4.12 Tióis não proteicos</i>	45
<i>4.13 Estimativas modelos de regressão</i>	45
<i>4.14 Correlações</i>	48
DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	87
<i>Anexo I Locais de produção de espécies reativas de oxigênio e sistemas de defesa.</i>	88
APÊNDICE	89
<i>Apêndice I Curva de retenção da água da mistura solo + substrato.</i>	90

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] possui relevância mundial, pois é amplamente utilizada para a alimentação humana e animal. O seu cultivo pode ser influenciado por diversas situações estressantes, causadas por fatores bióticos ou abióticos. Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico é o de principal ocorrência, e o mais limitante para a produtividade da cultura. Portanto, esse estresse hídrico já foi amplamente estudado em diversas culturas, incluindo-se a soja, e diversas alterações decorrentes desse estresse foram elucidadas, assim como os danos causados nas plantas e a ativação dos mecanismos de defesa.

Mecanismos de defesa podem também ser ativados pela aplicação de fungicida, o qual protege as plantas da incidência de doenças, deixando-as mais saudáveis, permitindo expressar seu potencial produtivo. Isso acontece, pois sem a incidência de doenças, as folhas ficam fotossinteticamente ativas por um período mais prolongado.

No entanto, não podemos deixar de considerar que o fungicida é uma molécula aplicada exogenamente estranha à fisiologia da planta, e portanto é um xenobiótico, e que em determinadas situações poderá também causar efeitos negativos.

A bioquímica e fisiologia também já foram avaliadas em plantas submetidas à aplicação de fungicida, sendo que as respostas foram variáveis dependendo da cultura avaliada e da molécula aplicada.

Outra prática que vem sendo utilizada no sentido de maximizar a produtividade é a aplicação de produtos que tem a finalidade de amenizar estresses celulares, e torná-las mais tolerantes às variações ambientais e de manejo.

Dentre estes, os bioestimulantes se destacam como produtos aplicados exogenamente que causam efeitos similares aos hormônios da plantas, melhorando assim o desempenho agrônômico das plantas.

No entanto, como a incidência de ocorrências de estresse hídrico vem se intensificando, e grande parte das alterações e rotas de defesa já conhecidas, os pesquisadores perceberam que precisavam entender o comportamento da planta no seu local de produção, onde uma situação de estresse não é isolada, e sim combinada com outros fatores estressantes.

Assim, as pesquisas se intensificaram em estudos com exposição concomitante a mais de um tipo de situação desfavorável, ou seja, estudos com estresses combinados. Desta forma, como as condições de campo, muitas vezes exigem que a aplicação de fungicidas nas culturas ocorra simultaneamente numa condição de restrição hídrica, se torna relevante saber os efeitos destes fatores combinados.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos interativos na bioquímica e fisiologia de plantas de soja submetidas simultaneamente à aplicação de fungicida e a condições de déficit hídrico, e a possível atenuação de danos às plantas pela aplicação de bioestimulante, em ambiente protegido.

As hipóteses do presente trabalho sugerem que plantas de soja submetidas a estresses combinados de déficit hídrico e fungicida vão apresentar maior estresse oxidativo, e portanto maiores danos, os quais poderão ser amenizados nas plantas que receberem a aplicação de bioestimulante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Déficit hídrico

A cultura da soja é produzida mundialmente, e é destaque no Brasil, sendo um dos principais produtos produzidos pela agricultura, justificada pela sua importância e utilização na alimentação, humana ou animal. No Brasil, a produtividade desta cultura é limitada principalmente pelo estresse hídrico (SENTELHAS et al., 2015). Apesar da produtividade das culturas ser afetada por diversos tipos de estresse, bióticos ou abióticos, o estresse hídrico é considerado o de principal ocorrência, e o que mais afeta negativamente o desenvolvimento das culturas (ELDAKAK et al., 2013; HABIBI, 2014; FARNESE et al., 2016; MA et al., 2017).

O estresse por déficit hídrico ocorre quando há disponibilidade hídrica insuficiente por períodos intermitentes ou contínuos (TAIZ et al., 2017). De acordo com estes autores, condições de baixa umidade relativa do ar, mesmo com conteúdo de água adequado no solo, podem também levar a déficit hídrico na planta, pois causam amplos gradientes de pressão de vapor, por meio do qual ocorre perda de água por transpiração. Estas condições acarretam no fechamento estomático, redução na fotossíntese (YANG et al., 2014; CHAVARRIA et al., 2015), e conseqüentemente na redução da assimilação líquida de carbono (FAROOQ et al., 2009).

A reduzida capacidade fotossintética faz com que ocorra liberação do excesso de energia de excitação, favorecendo a produção de espécies reativas de oxigênio (HUANG et al., 2013), através da cadeia transportadora de elétrons (NOCTOR et al., 2014). O efeito nocivo destas espécies pode ser incrementado pela prejudicada atividade do sistema antioxidante, causado por aumentos na temperatura das células (TAIZ et al., 2017).

Com relação a respiração das plantas frente à restrição de água, as respostas ainda não estão bem esclarecidas, tendo sido observados aumentos nas taxas de respiração (BARTOLI et al., 2005), nenhum efeito (GALMÉS et al., 2007) e até mesmo decréscimos

(GALMÉS et al., 2007; MOHAMMADKHANI; HEIDARI, 2007; AYUB et al., 2011; ESCALONA et al., 2012).

2.2 Xenobiótico

Aplicações de fungicida também podem afetar o processo fotossintético das plantas (PETIT et al., 2012), causando alterações no seu metabolismo (VENANCIO et al., 2003). Dentre essas alterações foram observados o decréscimo na taxa de fotossíntese e na condutância estomática das plantas (PETIT et al., 2012). A respiração também sofreu decréscimos com a aplicação de estrobilurinas (FAGAN et al., 2010). De acordo com estes autores essa redução pode ser importante, uma vez que em condições de estresse o metabolismo de manutenção é aumentado, e portanto, com a redução na taxa de respiração, a planta reduz o desperdício de energia com este metabolismo.

Alguns efeitos adicionais destas aplicações podem causar influência positiva, como é o caso dos fungicidas do grupo químico das estrobilurinas que, além de outros efeitos, são responsáveis por aumentar a concentração de ácido abscísico nas células (VENANCIO et al., 2003). Isto pode acarretar em controle da abertura estomática e melhor utilização de água em situações de estresses ambientais como a falta de água (TAIZ et al., 2017).

Além disso, fungicidas podem induzir a formação de óxido nítrico, que atua como um mensageiro chave nas plantas (VENANCIO et al., 2003). O óxido nítrico pode contribuir para a percepção de uma situação de estresse, e alertar para a planta o acionamento de seus mecanismos de defesa, como, por exemplo, os mecanismos antioxidantes (KANUNGO; JOSHI, 2014). Neste sentido, aumentos na atividade da enzima nitrato redutase foram observados em plantas de soja que receberam a aplicação de estrobilurina (FAGAN et al., 2010).

2.3 Bioestimulantes

As defesas das plantas podem ser induzidas ainda pela aplicação de produtos bioestimulantes (DURANGO et al., 2013). A aplicação destes produtos pode resultar em mudanças na composição química, aumento na acumulação de biomassa, e até mesmo incrementos em produtividade (KLAHOLD et al., 2006; MOTERLE et al., 2008; ALBRECHT et al., 2012; DU JARDIN, 2015).

Estes produtos são eficientes em baixas doses, atuando em processos metabólicos e fisiológicos, podendo aumentar a absorção e eficiência de nutrientes, e em condições adversas, podem reduzir as perdas, pela minimização dos danos (DU JARDIN, 2015; YAKHIN et al., 2017). Os bioestimulantes são, por isso, considerados estratégias inovadoras para minimizar os impactos causados por estresses (UGENA et al., 2018).

Uma definição de bioestimulante proposta por Yakhin et al. (2017) é que se trata de um produto de origem biológica que melhora a produtividade da planta através das propriedades de constituintes complexos, e não apenas devido à presença de nutrientes, hormônios vegetais, reguladores de crescimento ou compostos protetores.

Sugere-se que incrementos de produtividade desencadeados por estes produtos podem ser decorrentes de aumentos na fotossíntese, no transporte de íons, na produção de proteínas e aminoácidos (KHAN et al., 2009; PARADIKOVIĆ et al., 2011; YAKHIN et al., 2017). Enquanto que os efeitos de proteção destes compostos frente a estresses bióticos e abióticos seriam associados a reduções na produção de espécies reativas de oxigênio, ativação do sistema antioxidante de defesa e incrementos na produção de compostos fenólicos (ERTANI et al. 2013; YAKHIN et al., 2017). Assim, indica-se a capacidade dos bioestimulantes em atuar como osmorreguladores, moléculas de sinalização e, moduladores da abertura estomática (KAUFFMAN; KNEIVEL; WATSCHKE, 2007).

2.4 Estresses combinados

Apesar do estresse hídrico ser o estresse de ocorrência mais frequente, e fungicidas afetarem o processo fotossintético das plantas, estudos recentes têm justificado que, em condições de campo, as plantas não estão expostas a um tipo de estresse isolado, mas sim a uma combinação de estresses (ISLAM et al., 2016; ZANDALINAS et al., 2017). Assim, embora o conhecimento sobre o desempenho da planta num ambiente com restrição hídrica já esteja em boa parte consolidado, conhecer as respostas das plantas em ambientes onde atuem múltiplos estresses ainda precisa ser elucidada (FAROOQ et al., 2009; PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015).

Portanto, tradicionalmente as pesquisas eram direcionadas às respostas das plantas a estresses isolados, o que se torna incompatível com as condições de campo da realidade (ISLAM et al., 2016). Por isso, nos últimos anos esforços tem sido feitos para entender as respostas das plantas a estresses combinados (MITTLER, 2006; ZANDALINAS et al., 2017). Uma situação de estresse combinado, quando há a exposição simultânea da planta a condições diferenciadas de estresse, significa um novo estado de estresse, e para tanto exige novos mecanismos e diferentes vias de resposta de defesa (MITTLER, 2006; LI et al., 2011; PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015; ISLAM et al., 2016).

Estas vias de resposta podem estar relacionadas de forma sinérgica ou antagonista, sendo que a combinação de seca com calor ou ataque de patógenos, por exemplo, tem interação potencialmente negativa (MITTLER, 2006). Mas existem combinações de estresses que podem trazer efeitos benéficos às plantas, se comparados com os efeitos causados por estes estresses isolados (MITTLER; BLUMWALD, 2010).

Plantas sob estresse tem seu crescimento prejudicado e sua produtividade diminuída, e esses efeitos prejudiciais podem ser maximizados quando essas plantas estiverem sob o efeito de diferentes estresses combinados (CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016). Estudos como o de Vile et al. (2012) mostraram que plantas sob o efeito de dois estresses combinados podem ter seu processo de desenvolvimento determinado pelo estresse mais severo que está sendo exposta essa planta.

Plantas de pepino quando expostas a estresse salino e infecção fúngica, isolados e combinadamente, apresentaram diferentes estratégias de defesa (NOSTAR et al., 2013). Assim como o estudo com *Arabidopsis* que demonstrou um mecanismo de regulação estomático único para a combinação de estresse hídrico e alta temperatura (ZANDALINAS et al., 2016).

Estresses de alta salinidade combinados com choque térmico afetaram o metabolismo da planta de forma diferente, do que quando aplicados de maneira isolada (LI et al., 2011). Plantas de *Suaeda salsa* L. sob esta combinação de estresses tiveram suprimida a fotossíntese e induzidas proteínas relacionadas à produção de energia, transporte de material e indução de sinal (LI et al., 2011). Estes autores sugerem que estes resultados se devem à indução de um programa genético único, diferente daquele induzido sob condição de estresse isolado.

Plântulas de *Brachypodium distachyon* sob estresse osmótico e exposição ao cádmio combinados apresentaram maiores impactos no crescimento, mudanças fisiológicas e estruturas das folhas, quando comparados com estes estresses isolados (CHENG et al., 2018). Alguns estresses abióticos também podem ter seus impactos agravados quando pela deficiência nutricional, uma vez que a energia e nutrição destas plantas são importantes para a aclimação ao estresse e para função de muitas enzimas antioxidantes (ZANDALINAS et al., 2018). A eficiência do uso da água, baseado na assimilação líquida de carbono, foi outra variável fortemente afetada em genótipos de trigo, quando expostos a estresses combinados de seca e alta temperatura (URBAN et al., 2018).

Por outro lado, alguns estudos tem mostrado resultados positivos, em que efeitos favoráveis foram observados quando estresses foram combinados, em comparação com estresses isolados (IYER; TANG; MAHALINGAM, 2013; RIVERO et al., 2013; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2013; ZANDALINAS et al., 2018).

Por exemplo, plantas de arroz cultivadas sob condições de estresse salino ou sob aplicação de 2,4-D tiveram maiores efeitos sob estes estresses isolados, do que em

comparação com estes estresses combinados, onde a aplicação do 2,4-D atua como atenuador do estresse salino (ISLAM et al., 2016).

Plantas sob estresse de seca combinado com ataque de vírus apresentaram variabilidade na respiração foliar, sendo concluído pelos autores que esses ajustes específicos no metabolismo respiratório explicariam a manutenção do balanço de carbono e crescimento dessas plantas sob esses estresse combinados (AOU-OUAD et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeito da pesquisa e local do experimento

Sementes de soja da cultivar Intacta RR2PRO 5958 foram semeadas em vasos plásticos de 11 L contendo solo e substrato na proporção de 2:1. A composição da mistura solo e substrato apresentava as seguintes características químicas: 35,9% argila, 6,0 pH em água, 6,2 índice SMP, 37,1 mg/dm³ fósforo, 132 mg/dm³ potássio, 4,5% matéria orgânica, 12,1 cmol_c/dm³ cálcio, 2,4 cmol_c/dm³ magnésio, 18,3 cmol_c/dm³ CTC, 81% saturação de bases, 24 cmol_c/dm³ enxofre, 0,4 cmol_c/dm³ boro, 4,5 cmol_c/dm³ manganês, 4,02 cmol_c/dm³ zinco, 1,35 cmol_c/dm³ cobre. Com relação a características físico-hídricas, a densidade calculada para a mistura foi de 0,97 g/cm³ e a porosidade total de 0,62 m³/m³.

Após a emergência das plântulas procedeu-se o raleio, mantendo-se quatro plântulas por vaso. Estas foram cultivadas em câmara de crescimento nas condições de: 14 horas de luz, temperatura de 25±2 °C e densidade de fluxo de fótons de 300 μmol/m²/s. Durante o seu desenvolvimento as plantas receberam a mesma quantidade de água, de acordo com a necessidade, e quando atingiram o estágio de desenvolvimento V8, que é o desenvolvimento do oitavo nó e representa a presença da sétima folha trifoliolada completamente desenvolvida (FEHR; CAVINESS, 1977), foram submetidas a diferentes manejos de irrigação, para obtenção de diferentes potencias da água do solo. Em cada

vaso foi colocado 1 L de água, e então manteve-se durante oito, seis, quatro e dois dias sem irrigação.

3.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 32 tratamentos e três repetições. Estes foram provenientes de dois experimentos com quatro diferentes potenciais da água do solo cada, com e sem aplicação de fungicida e com e sem aplicação de bioestimulante.

Experimento I. Os tratamentos foram: $\Psi_1 = -0,0245$ MPa (8 dias sem irrigação); $\Psi_2 = -0,0074$ MPa (6 dias sem irrigação); $\Psi_3 = -0,0018$ MPa (4 dias sem irrigação); $\Psi_4 = -0,0008$ MPa (2 dias sem irrigação).

Experimento II. Os tratamentos foram: $\Psi_1 = -0,2286$ MPa (8 dias sem irrigação); $\Psi_2 = -0,0332$ MPa (6 dias sem irrigação); $\Psi_3 = -0,0164$ MPa (4 dias sem irrigação); $\Psi_4 = -0,0029$ MPa (2 dias sem irrigação).

Em ambos os experimentos foi realizada a aplicação de fungicida (FOX[®]) na dose de 0,4 L/ha, e de bioestimulante (FOLTRON[®] Plus), na dose de 1 L/ha no momento em que o solo atingiu estes potenciais da água do solo. Composição fungicida: 150 g/L trifloxistrobina, 175 g/L protioconazol e 775 g/L ingredientes inertes. Composição biostimulante: 10% nitrogênio total amoniacal, 20% fósforo, 5% potássio, 100 ppm magnésio, 80 ppm boro, 50 ppm cobre, 500 ppm ferro, 100 ppm manganês, 2 ppm molibdênio, 500 ppm de zinco, 7,8 g/L ácidos húmicos, 2.750 ppm folcisteína e 30 ppm giberelinas.

3.3 Procedimentos

Quando a mistura de solo e substrato atingiu os potenciais da água do solo foi realizada a aplicação dos produtos nos tratamentos correspondentes, e 1 hora após iniciaram-se as avaliações fisiológicas, enquanto que a coleta para as avaliações

bioquímicas ocorreu 48 horas depois da aplicação. Para a aplicação utilizou-se uma barra de pulverização pressurizada com CO₂, sendo o volume de aplicação de 150 L/ha e ponta jato plano defletor (TT 11002).

Durante a condução do experimento, para a obtenção do teor de água da mistura solo e substrato, foram coletadas duas amostras de cada tratamento, em profundidade no vaso. A capacidade de retenção de água foi determinada no final do experimento, quando amostras com estrutura preservada foram coletadas, através de cilindros volumétricos. Essas amostras foram então saturadas com água e submetidas às tensões matriciais de 0,01; 1; 6; 10; 100 e 300 kPa, utilizando funis de placas porosas e câmara de Richards. Para obter o conteúdo de água retido em potenciais matriciais superiores, utilizou-se 10 amostras de solo deformadas colocadas em cápsulas de metal, e determinação do potencial matricial através do psicrômetro de termopar do modelo WP4-T Dewpoint Potential Meter (Decagon Device, 2000). Os resultados obtidos de umidade, em função do potencial da água foram ajustados ao modelo de Carducci et al. (2011) através da equação duplo van Genuchten (Apêndice I).

3.3.1 *Status* hídrico da planta

a) Potencial da água da folha

O potencial da água da folha foi avaliado no 6º trifólio totalmente expandido utilizando-se uma câmara de pressão de Scholander (Marca: Soil Moisture, Modelo: 3115).

b) Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água da planta foi avaliado no 5º trifólio totalmente expandido, de acordo com a metodologia proposta por Cavalcanti et al. (2004). Para estimar o conteúdo relativo de água foram coletados 30 discos foliares de 1 cm, os quais foram pesados. Então foram colocados em placas de Petri contendo água destilada, e mantido por sete horas, a 25 °C sob luz de 300 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$. Após esse período foram

pesados novamente para a obtenção do peso túrgido. Os discos foram então secos em estufa de circulação de ar, em 60 °C até massa constante, quando foram pesados novamente. O conteúdo relativo de água foi calculado através da equação: Conteúdo relativo de água = (massa discos frescos – massa discos secos) / (massa discos túrgidos – massa discos secos) * 100.

c) Condutância estomática

A condutância estomática foi avaliada no folíolo central do 6° trifólio totalmente expandido, com o auxílio de um porômetro foliar (Marca: Delta-T Devices, Modelo: AP4).

3.3.2 Temperatura da folha

A temperatura da folha foi medida no folíolo central do 7° trifólio totalmente expandido através de um termômetro digital infravermelho, com emissividade de 0,95 (Marca: RayTemp, Modelo: 8).

3.3.3 Pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de clorofila *a*, *b* e total foi estimado no folíolo central do 4° trifólio totalmente expandido através de clorofilômetro (Marca: Falker, Modelo: ClorofiLog). Estes foram expressos pelo índice de clorofila Falker (ICF), que é um valor relativo do conteúdo de clorofila e é baseado em correlações de absorvância e reflectância.

3.3.4 Rendimento quântico do fotossistema II e fluorescência total da clorofila

A fluorescência da clorofila e o rendimento quântico do fotossistema II (FSII) foram determinados no folíolo central do 4° trifólio totalmente expandido com a utilização de um fluorômetro portátil (Marca: Fluorpen, Modelo: FP-100).

3.3.5 Extração enzimática

O 8º e 9º trifólios totalmente expandidos foram cuidadosamente coletados e imediatamente após a coleta pesados, para obtenção da massa fresca. Após isso, o material coletado foi macerado em solução tampão fosfato de potássio (pH 6,8), sendo necessária para homogeneização a utilização de tampão em um volume de quatro vezes a massa fresca e centrifugado a 3000 rpm e força G de 250, durante 10 minutos. O sobrenadante (extrato) foi pipetado em eppendorfs e armazenado em ultrafreezer em temperatura de -80 °C (± 2 °C) para a realização das análises posteriores.

3.3.6 Proteína

A proteína do extrato enzimático foi determinada de acordo com metodologia de Bradford (1976). Foram adicionados em um tubo 300 μ L de extrato e 3 mL de Bradford. Esses tubos foram mantidos incubados no escuro durante 10 minutos. Após isso procedeu-se a leitura da absorbância, em espectrofotômetro a 595 nm. O cálculo da proteína foi realizado com base em equação obtida na curva utilizando padrões de albumina.

3.3.7 Espécies reativas de oxigênio

d) Superóxido

A concentração de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi determinada de acordo com a metodologia de Chaitanya; Naithani (1994). Foram realizadas duplicatas, sendo adicionados 100 μ L do extrato enzimático a uma mistura contendo 100 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2), 1 mM de dietilditiocarbamato de sódio, e 0,25 mM de azul de nitro-tetrazólio. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm, durante três minutos e a concentração de $O_2^{\cdot-}$ determinada pela subtração da absorbância final (aos 3 minutos) pela inicial (aos 0 segundos).

e) Peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificado pelo método de Loreto; Velikova (2001). A análise realizou-se em duplicatas, em placa de Elisa, sendo adicionados em cada poço 50 μ L de extrato enzimático, 50 μ L de 1M de iodeto de potássio e 100 μ L de tampão fosfato de potássio (pH 7,0). A leitura da absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 390 nm. As concentrações de H_2O_2 das amostras foram estimadas a partir da multiplicação da absorbância pelo fator de correção 0,54.

A detecção *in situ* do H_2O_2 foi realizada seguindo-se metodologia de Thordal-Christensen et al. (1997). O 7° trifólio foi coletado cuidadosamente, e o folíolo central deste foi colocado em tubos de ensaio contendo uma solução de tampão 10 mM de MES (pH 5,8) e DAB (tetraidracloro de diaminobenzidina – 3.3' diaminobenzidina). Os tubos foram incubados em luz de 300 μ mol/m²/s durante 12 horas. Após esse período retirou-se a solução dos tubos e acrescentou-se álcool 95%, e os tubos foram colocados em banho maria a 100 °C por 10 minutos para remoção da clorofila. Após esse período os folíolos foram retirados dos tubos e fotografados. De acordo com os autores que propõem este método, o DAB é absorvido pelo tecido vivo da planta, e captura o H_2O_2 , ou seja o composto polimeriza instantaneamente os locais de atividade com um polímero de castanho avermelhado. Portanto, locais de presença de H_2O_2 foram registrados nas fotografias, em coloração marrom-avermelhada.

3.3.8 Danos oxidativos

f) Dano de membrana

O dano de membrana foi avaliado no 6° trifólio totalmente expandido, a partir da perda de eletrólitos, segundo metodologia de Cavalcanti et al. (2004). Destes trifólios foram retirados 20 discos foliares de um centímetro, colocados em tubos falcon contendo 20 mL de água deionizada. Estes foram mantidos sob agitação durante 12 horas, a 25 °C. Após isso foi realizada a avaliação da condutividade hidráulica da água, em condutivímetro digital. Então, os tubos foram colocados em banho maria por uma hora, a

95 °C, para a liberação de todos os eletrólitos. Após esse tempo, foram retirados, esfriados e realizada a leitura da condutividade hidráulica novamente. O dano de membrana foi calculado pela divisão da leitura inicial pela leitura final, e multiplicado por 100 para transformação em percentual.

g) Malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) estima a peroxidação lipídica, a qual é avaliada como indicadora de dano de membrana das células. Essa variável foi determinada seguindo a metodologia adaptada de Heath; Packer (1968), que faz a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no tecido. Foram colocados em um tubo 400 µL de extrato enzimático, e adicionados 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. Esse tubo foi incubado em banho-maria a 100 °C durante 15 minutos, esfriado e centrifugado a 2000 rpm e força G de 250, durante 15 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 535 nm, e o conteúdo de MDA calculado a partir da equação gerada pela curva padrão com MDA.

3.3.9 Enzimas antioxidantes

h) Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada através da capacidade da SOD em reduzir fotoquimicamente o azul de nitro-tetrazólio, pelo método de Del Longo et al. (1993). Foram realizadas duplicatas, sendo adicionados 40 µL de extrato enzimático em 960 µL de uma mistura contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 13 mM de metionina, 75 µM de azul de nitro-tetrazólio, 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 2 µM de riboflavina. Este homogeneizado foi mantido durante 10 minutos em 25 °C incubado sob a exposição de lâmpada de 15W. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 560 nm, a qual registrou a produção de azul de formazan, resultante da fotorrecuperação do azul de nitro-tetrazólio (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Um dos brancos foi mantido junto com as amostras

incubado na luz (branco do claro), e o outro mantido no escuro, durante 10 minutos. O valor obtido para as amostras foi subtraído do valor encontrado na subtração da leitura do branco escuro pela leitura do branco do claro. Assim, uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do azul de nitro-tetrazólio em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

i) Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adaptação do método proposto por Cakmak; Marschner (1992) baseada na taxa de decomposição do H_2O_2 . Foram realizadas duplicatas, sendo adicionados 50 μ L de extrato enzimático em 1950 μ L de uma mistura contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) e 20 mM de H_2O_2 . A reação foi medida em espectrofotômetro, a 240 nm por um minuto a 25 °C. A atividade da CAT foi calculada pela subtração da absorbância final (1 minuto) pela inicial (0 segundos), e dividida pelo coeficiente de extinção de 36 M/cm (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995).

j) Ascorbato peroxidase

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi medida pela adição de 25 μ L de extrato enzimático em uma mistura contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H_2O_2 e 0,8 mM de ascorbato, de acordo com metodologia de Nakano; Asada (1981). As leituras foram medidas em espectrofotômetro, a 290 nm pela taxa de oxidação ascorbática em um minuto, a 25 °C. A atividade da APX foi calculada pela subtração da absorbância final (1 minuto) pela inicial (0 segundos), e dividida pelo coeficiente de extinção de 2,8 mM/cm.

3.3.10 Antioxidantes não enzimáticos

k) Tióis não proteicos

O conteúdo de tióis não proteicos foi avaliado de acordo com método adaptado de Griffith (1980). Foram colocados 500 µL de extrato enzimático em um tubo, sendo adicionados 500 µL de TCA a 10%. Colocados para centrifugar por 20 minutos a 2000 rpm e força G de 250. Foram retirados 800 µL do sobrenadante e reagidos com 80 µL de ácido 5,5''-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 412 nm e o conteúdo de tióis não proteicos calculado com base na equação obtida pela curva gerada a partir de padrões de cisteína.

3.4 Análise estatística

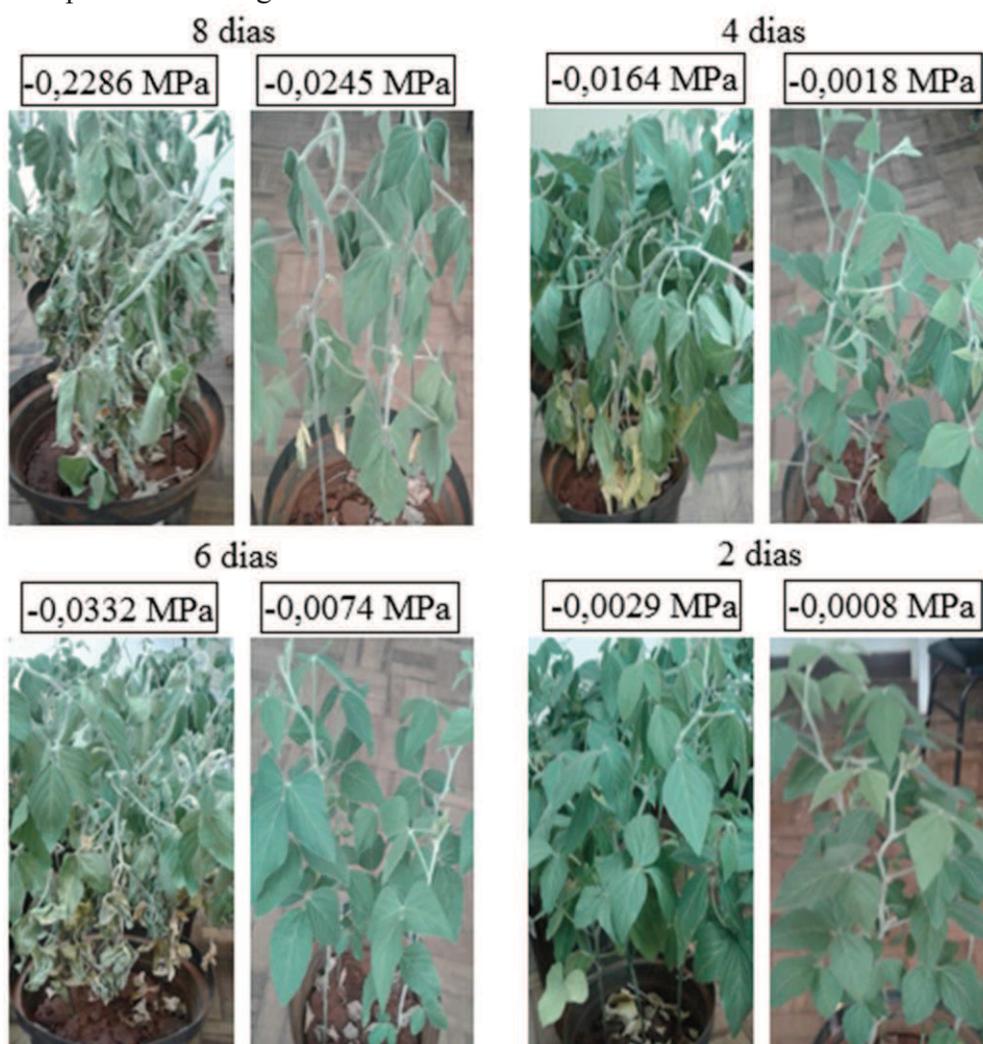
Os dados de cada experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Equações de regressão e análise de correlação também foram realizadas a 1, 5 e 10% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS

4.1 Sintomas visuais na turgescência

O déficit hídrico foi gradualmente induzido nas plantas de soja pela restrição de água durante dois, quatro, seis e oito dias. Comparativamente com as plantas dois dias sem irrigação, as plantas com restrição hídrica durante seis e oito dias mostraram-se visualmente murchas, com perda da turgescência (Figura 1).

Figura 1 - Sintomas visuais observados na turgescência de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo.

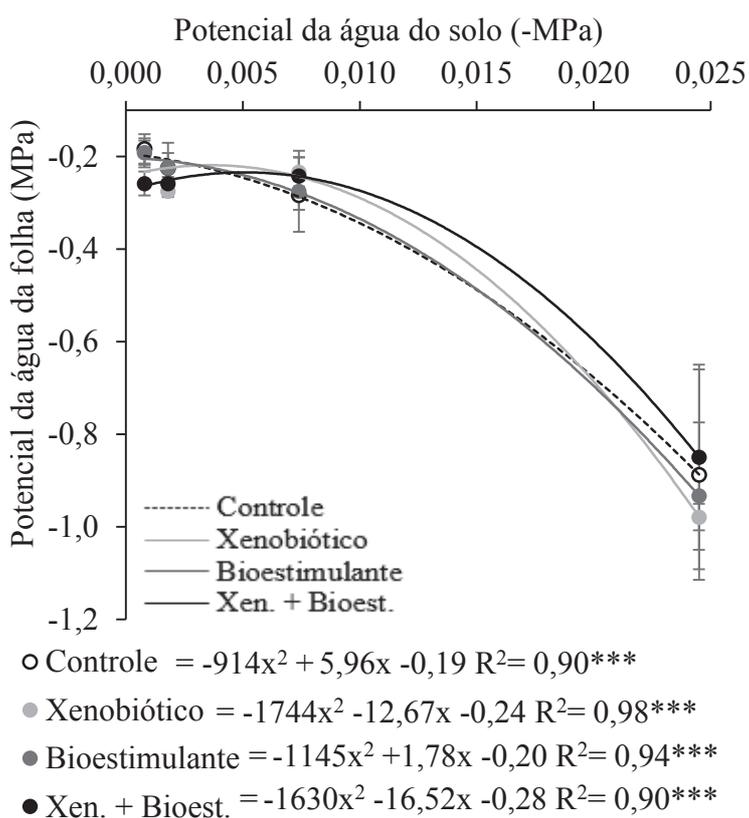


4.2 Status hídrico da planta

4.2.1 Potencial da água da folha

Os potenciais da água na folha tiveram variações de -0,183 MPa, para o controle até -0,258 MPa, xenobiótico + bioestimulante, no potencial da água do solo de -0,0008 MPa (Figura 2). Já no potencial da água do solo de -0,0245 MPa, a variação foi de -0,850 MPa, xenobiótico + bioestimulante, até -0,979 MPa, para as plantas tratadas com xenobiótico, o que representa um aumento de 0,129 MPa pela adição de bioestimulante. O potencial da água das plantas sob o menor potencial da água do solo, no primeiro experimento (-0,0245 MPa) foi 75% inferior quando comparado aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si.

Figura 2 - Potencial da água da folha de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo.



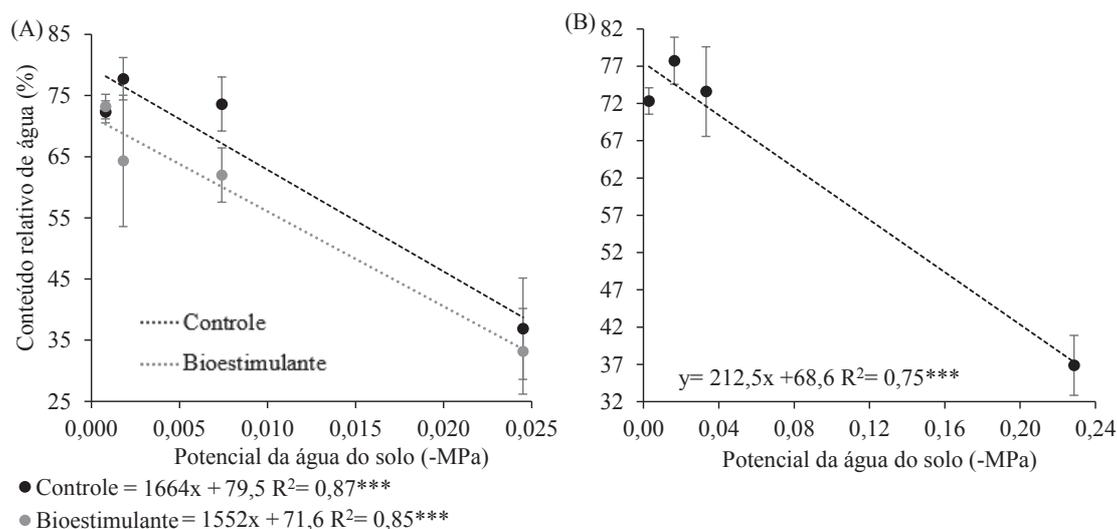
Fonte: Dados do autor.

Nota: Barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

4.2.2 Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água das plantas com oito dias sem irrigação diminuiu mais de 55% quando comparado com as plantas que tiveram irrigação restrita durante quatro e seis dias (Figura 3). Enquanto que essas atingiram um conteúdo relativo de água 15% inferior às plantas com irrigação cortada durante dois dias.

Figura 3 - Conteúdo relativo de água de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

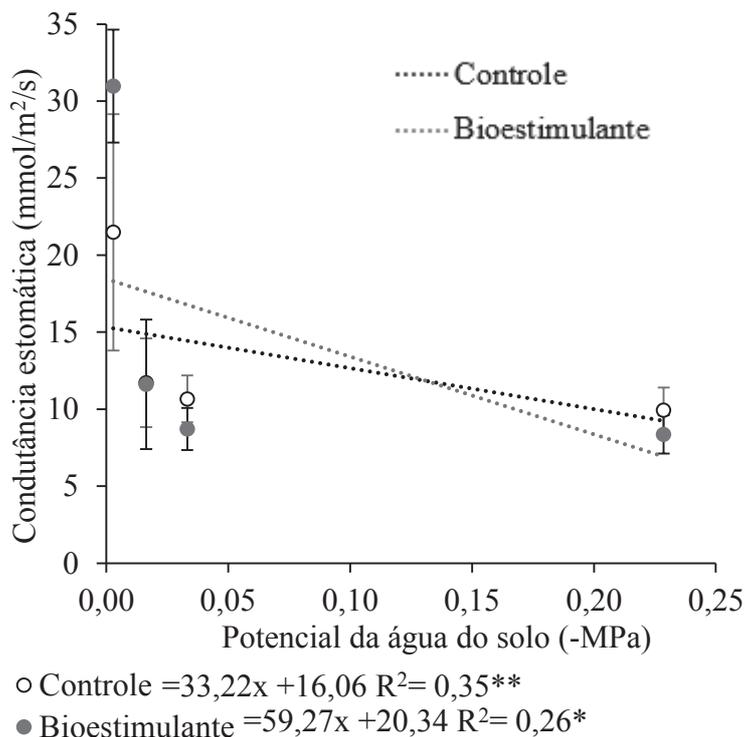
Nota: Conteúdo relativo de água das plantas no primeiro (A) e segundo (B) experimento. Barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

Como pode ser observado na figura 3A, a aplicação de bioestimulante não foi efetiva para melhorar o *status* hídrico das plantas.

4.2.3 Condutância estomática

Maiores trocas gasosas foram observadas para as plantas submetidas ao potencial da água do solo de -0,0008 MPa, tendo estas apresentado valores de condutância estomática 50% mais altos que as plantas dos demais potenciais da água do solo (Figura 4). Neste potencial, as plantas tratadas com bioestimulante apresentaram um aumento de 0,3 vezes na condutância estomática, em comparação ao controle.

Figura 4 - Condutância estomática de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

Nota: As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * ** *** Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

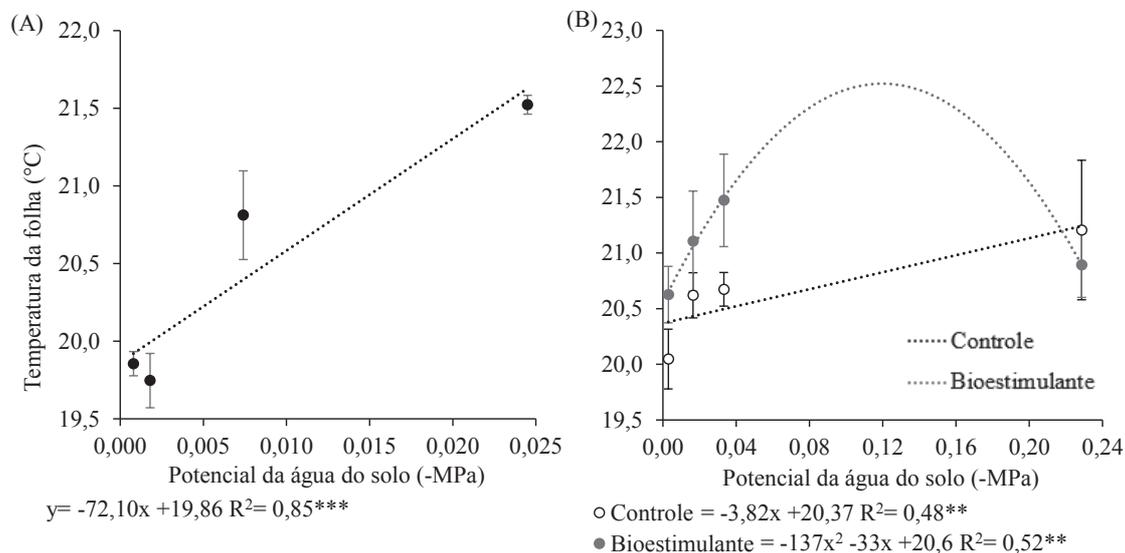
As equações de regressão também mostraram maiores proporções de aumento nas trocas gasosas para as plantas tratadas com bioestimulante, em comparação com as do controle, sendo 59,27 mmol/m²/s de aumento a cada potencial da água do solo para o bioestimulante, em comparação com 33,22 mmol/m²/s para o controle. Ainda, é possível observar que o modelo do tratamento bioestimulante parte de 20,34 mmol/m²/s, enquanto que o controle parte de 16,06 mmol/m²/s, demonstrando a contribuição do bioestimulante para maiores trocas gasosas.

4.3 Temperatura da folha

Para as plantas do controle aumentos na temperatura da folha são percebidos com a diminuição no potencial da água no solo. Assim, plantas de soja submetidas aos potenciais da água do solo de -0,0029, -0,0018 e -0,0008 MPa, apresentaram temperatura da folha significativamente menores, aproximadamente 20 °C, quando comparados com

as plantas dos demais potenciais, que enfrentaram mais dias de restrição hídrica (Figura 5).

Figura 5 - Temperatura da folha de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

Nota: Temperatura foliar das plantas no primeiro (A) e segundo (B) experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

As plantas sob oito dias de restrição de água apresentaram a maior temperatura foliar (21,52 °C), 0,7 °C maior que plantas sem irrigação durante seis dias, e em média 1,7 °C maior que plantas sem irrigação durante dois e quatro dias. A aplicação de bioestimulante aumentou a temperatura da folha até um patamar, e contribuiu para diminuir a temperatura quando plantas foram expostas a baixa disponibilidade de água (Figura 5B). De acordo com o modelo a temperatura aumenta até um ponto máximo de potencial de água no solo de -0,12 MPa, e depois diminui gradativamente.

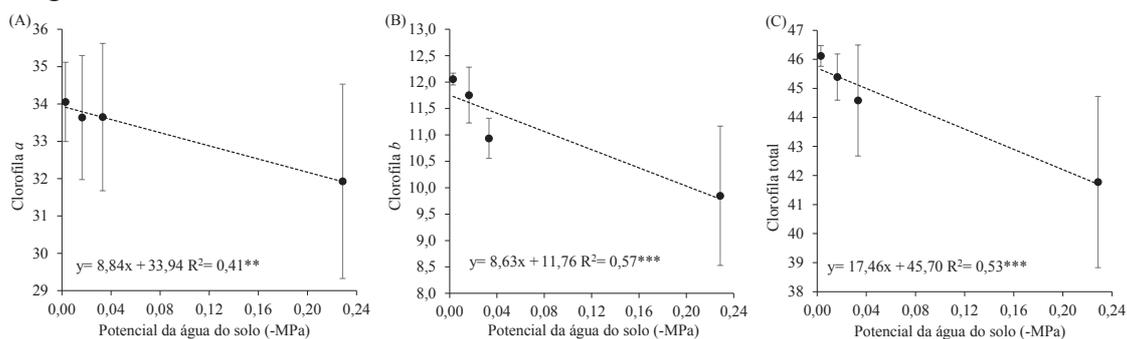
4.4 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram influenciados negativamente pelo déficit hídrico, sendo que, no segundo experimento, as plantas do potencial da água do solo mais baixo tiveram o conteúdo de clorofila *a* reduzido em mais de 6%, a clorofila *b* em 18% e

a clorofila total em quase 10%, quando comparadas ao tratamento com maior disponibilidade de água (Figura 6).

A partir das equações de regressão geradas foi possível observar o aumento de 8,8, 8,6 e 17,5 no índice de clorofila *a*, *b*, e total, respectivamente, para cada potencial da água do solo.

Figura 6 - Pigmentos fotossintéticos de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo.



Fonte: Dados do autor.

Nota: (A) Clorofila *a* (B) Clorofila *b* (C) Clorofila total de plantas no segundo experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * ** *** Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

A aplicação de xenobiótico e bioestimulante contribuiu para diminuir em média 5% o conteúdo de clorofila *a*, *b* e total das plantas de soja, no primeiro experimento (Tabela 1). No segundo experimento, a clorofila *b* aumentou 8% quando as plantas receberam aplicação de bioestimulante.

Tabela 1 - Pigmentos fotossintéticos de plantas de soja submetidas a aplicações de xenobiótico e bioestimulante.

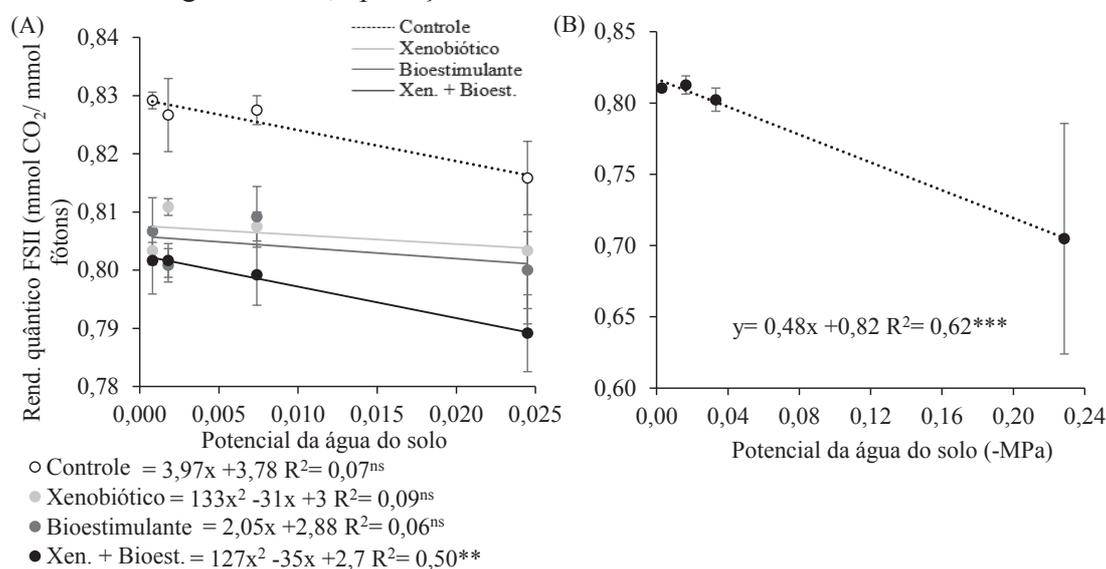
Pigmentos fotossintéticos	Experimento I				Experimento II	
	Xenobiótico		Bioestimulante		Bioestimulante	
	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM
Clorofila <i>a</i>	35,78 B	37,13 A	35,18 B	37,73 A	-	-
Clorofila <i>b</i>	10,29 B	11,65 A	10,23 B	11,71 A	11,61 A	10,69 B
Clorofila total	46,07 B	48,78 A	45,41 B	49,44 A	-	-

Fonte: Dados do autor. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa na linha, em cada tratamento, para cada experimento, a 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

4.5 Rendimento quântico do FSII e fluorescência total da clorofila

No experimento I, o rendimento quântico do fotossistema II (FSII) apresentou comportamento linear para plantas do controle e tratadas com xenobiótico e bioestimulante simultaneamente, tendo variações de 0,52 e 0,72, respectivamente para cada uma destas situações para cada potencial da água do solo (Figura 7A). Assim, observa-se que quanto menor a disponibilidade de água do solo, menor o rendimento quântico do FSII.

Figura 7 - Rendimento quântico do FSII de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.



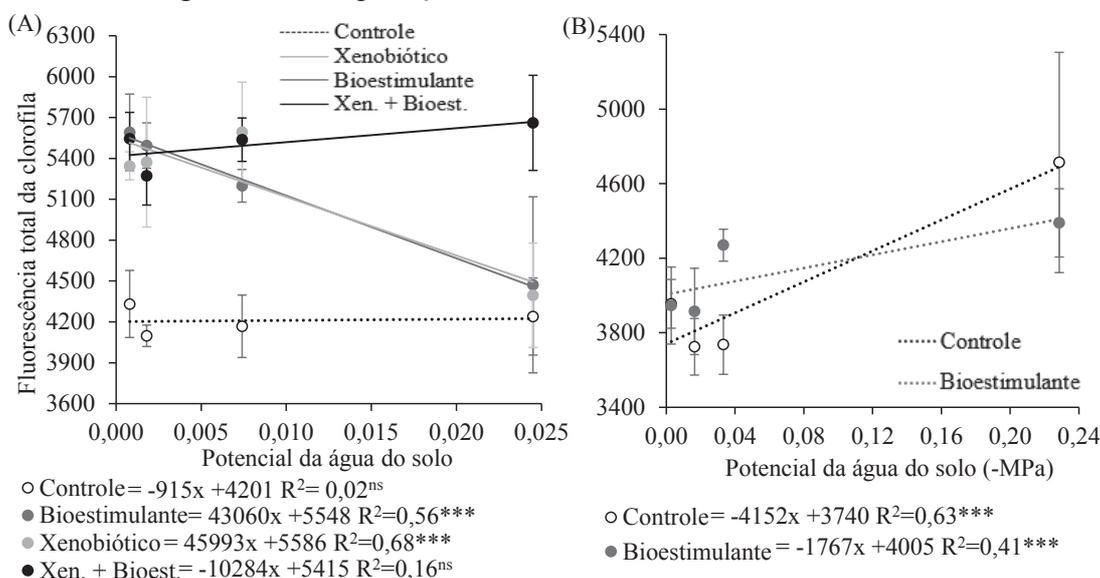
O rendimento quântico do FSII, no experimento II apresentou comportamento linear decrescente, sendo que diminuiu 13% nas plantas expostas ao potencial da água do solo mais baixo, de -0,2286 MPa (Figura 7B), comparado aos demais potenciais.

As plantas do primeiro experimento tratadas com xenobiótico e com bioestimulante apresentaram fluorescência total da clorofila com comportamento linear decrescente (Figura 8A). Estas apresentaram variações na fluorescência de 43060 e

45993, respectivamente a cada potencial da água do solo. Isto mostrou que as plantas que receberam essas aplicações apresentaram maior fluorescência nos potenciais mais altos.

Enquanto que, as plantas do controle não diferiram com relação à fluorescência da clorofila entre os diferentes potenciais, e as que receberam a aplicação concomitante dos dois tratamentos aumentaram a fluorescência no potencial mais negativo, a qual foi aproximadamente 4% maior que os demais.

Figura 8 - Fluorescência total da clorofila de plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

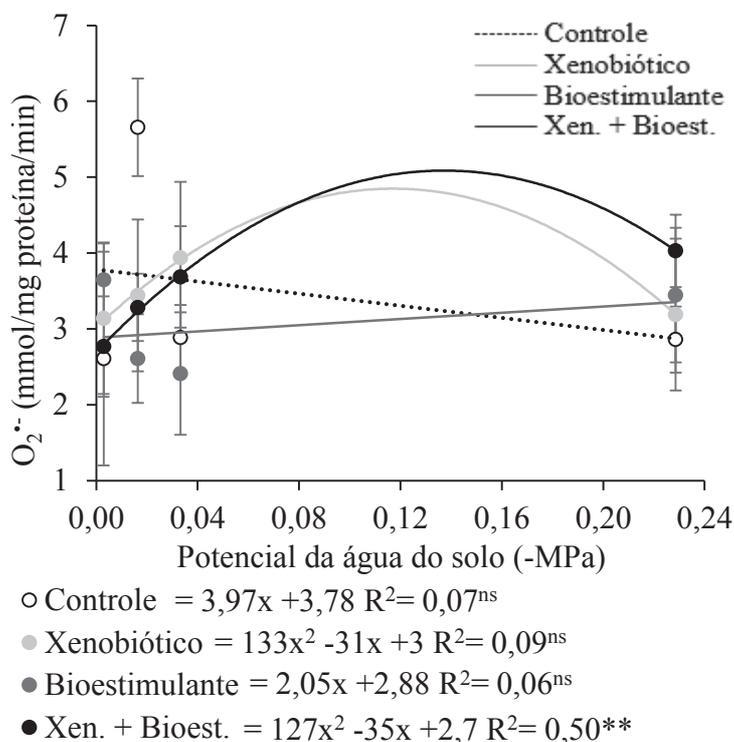
Nota: Fluorescência da clorofila no primeiro (A) e segundo (B) experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

A fluorescência da clorofila, no segundo experimento, apresentou significância para as plantas do controle e para as tratadas com bioestimulante (Figura 8B), e comportamento linear crescente. Observa-se a partir das equações de regressão que a cada -1 MPa de potencial da água do solo, a fluorescência aumenta 4152, enquanto que este aumento é reduzido quando tratadas com o bioestimulante, sendo um aumento de 1767 a cada -1 MPa.

4.6 Espécies reativas de oxigênio: Superóxido e peróxido de hidrogênio

Com relação ao controle, as plantas submetidas ao potencial -0,0164 MPa apresentaram a concentração de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) 50% maior, comparadas com as dos demais potenciais (Figura 9). De maneira geral, no segundo experimento, a aplicação de xenobiótico contribuiu para aumentar a produção de $O_2^{\cdot-}$, atingindo um máximo em -0,12 MPa. A concentração de $O_2^{\cdot-}$, no menor potencial da água do solo, foi maior para a aplicação concomitante dos produtos. Este tratamento atingiu produção máxima de $O_2^{\cdot-}$ no potencial -0,14 MPa.

Figura 9 - Concentração de superóxido em plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.



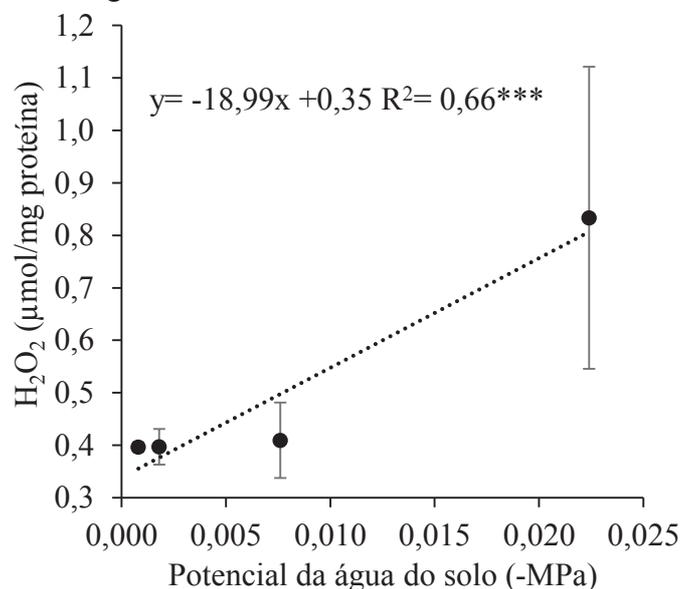
Fonte: Dados do autor.

Nota: As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), no primeiro experimento apresentou comportamento linear crescente, com um pico para as plantas que ficaram oito

dias sem água (-0,0245 MPa) (Figura 10). A cada unidade no potencial da água do solo (-1 MPa), a produção de H₂O₂ aumenta 18,99 μmol/mg proteína.

Figura 10 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio em plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo.



Fonte: Dados do autor.

Nota: As barras verticais representam ± o desvio padrão das amostras. * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

Com relação a aplicação de bioestimulante, no experimento I, a aplicação contribuiu para diminuir a produção das duas espécies reativas de oxigênio avaliadas, O₂^{•-} e H₂O₂ (Tabela 2). A aplicação de bioestimulante contribuiu para reduções de 45% na produção de O₂^{•-} e mais de 25% na produção de H₂O₂.

Tabela 2 - Produção de O₂^{•-} (mmol/mg proteína/min) e H₂O₂ (μmol/mg proteína) em plantas de soja tratadas com bioestimulante, no primeiro experimento.

Bioestimulante	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂
SEM	1,92 A	0,59 A
COM	1,05 B	0,43 B

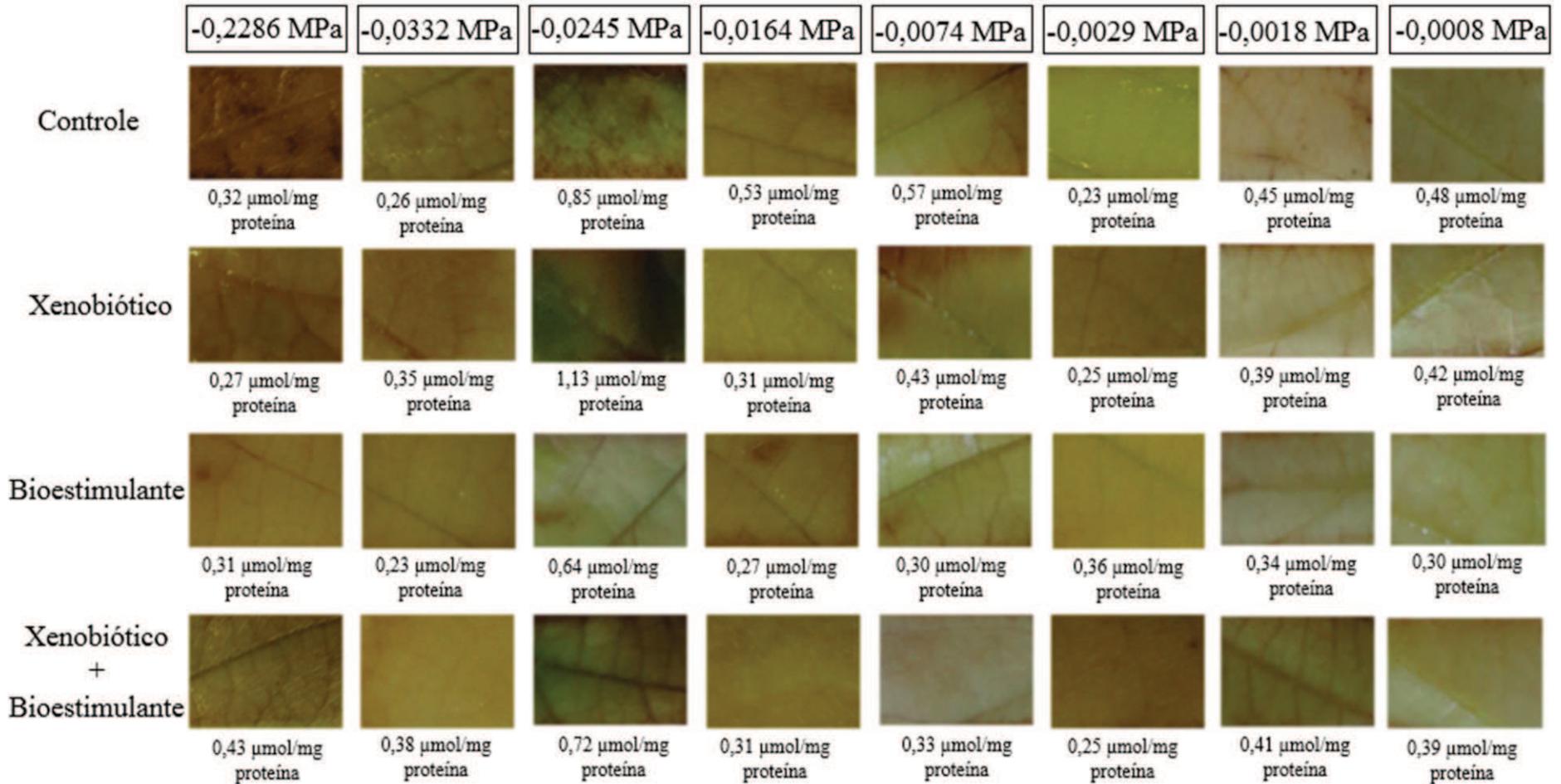
Fonte: Dados do autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa na coluna, a 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

A detecção *in situ* do H₂O₂ mostrou que a produção desta espécie reativa de oxigênio foi maior para os potenciais menores, quando a planta enfrentava um déficit

hídrico mais agressivo (Figura 11). Plantas submetidas ao potencial da água do solo - 0,0245 MPa foram as que apresentaram o maior número de pontuações de coloração marrom, indicando haver portanto maior número de locais com presença do H₂O₂.

Figura 11 - Detecção *in situ* do peróxido de hidrogênio em plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.



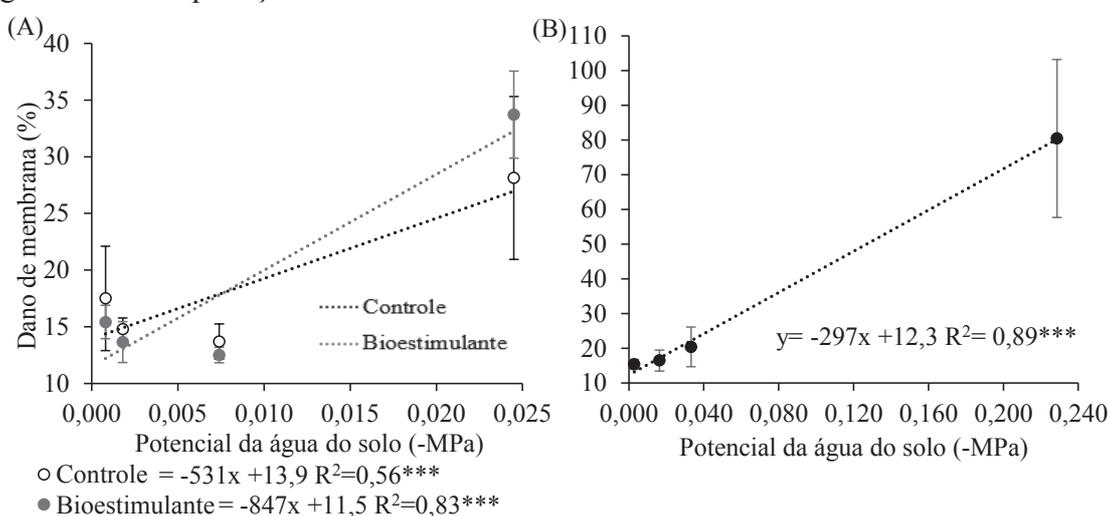
Plantas tratadas com xenobiótico, isolado ou em combinação com bioestimulante, também apresentaram mais pontuações, demonstrando maior concentração de H₂O₂ nas células destas plantas.

A detecção *in situ* do H₂O₂ mostrou que o bioestimulante reduziu acentuadamente as pontuações, indicando menor produção de H₂O₂ em plantas tratadas com bioestimulante.

4.7 Dano de membrana

O dano de membrana, no primeiro experimento, apresentou comportamento linear crescente (Figura 12A), tendo aumento de 531 e 847%, para cada potencial da água do solo, para plantas do controle e tratadas com bioestimulante, respectivamente. No potencial mais negativo, o dano de membrana foi 50% maior, em comparação com os demais potenciais da água do solo.

Figura 12 - Dano de membrana em plantas de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

Nota: Dano de membrana das plantas no primeiro (A) e segundo (B) experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

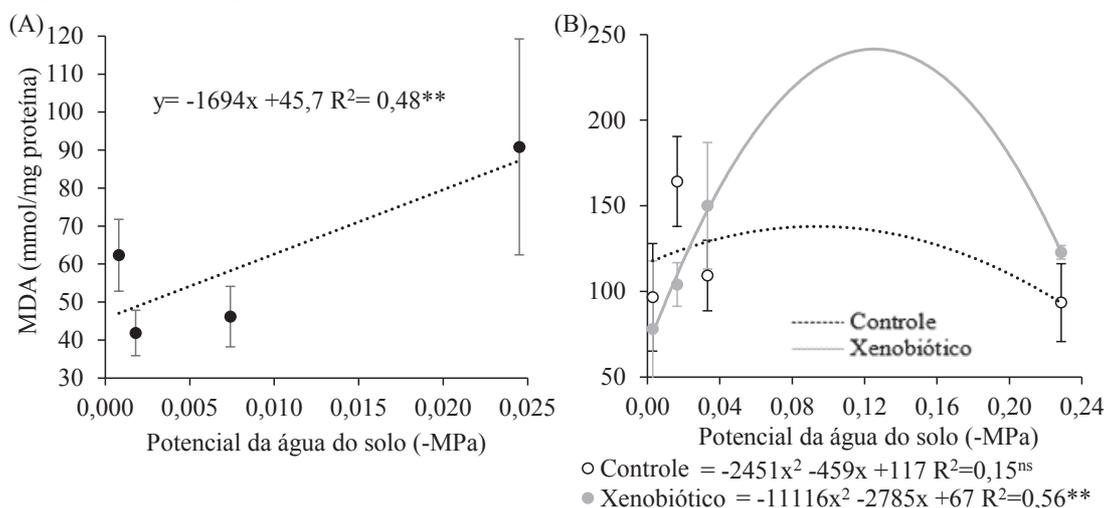
No segundo experimento, maior dano de membrana foi encontrado para plantas submetidas ao potencial da água do solo -0,2286 MPa (Figura 12B). Estas plantas

apresentaram quase 80% mais dano quando comparadas às plantas dos potenciais -0,0332, -0,0164 e -0,0029 MPa, as quais não diferiram entre si.

4.8 Malondialdeído

O conteúdo de malondialdeído (MDA) das plantas de soja sob restrição de água durante oito dias foi 45% maior, se comparado com o conteúdo das plantas que ficaram dois, quatro e seis dias sob déficit (Figura 13A). A regressão é linear crescente, sendo que a cada -1 MPa, aumenta 1694 mmol/mg proteína de MDA.

Figura 13 - Conteúdo de MDA em plantas de de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de xenobiótico.



Fonte: Dados do autor.

Nota: Conteúdo de MDA das plantas no primeiro (A) e segundo (B) experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

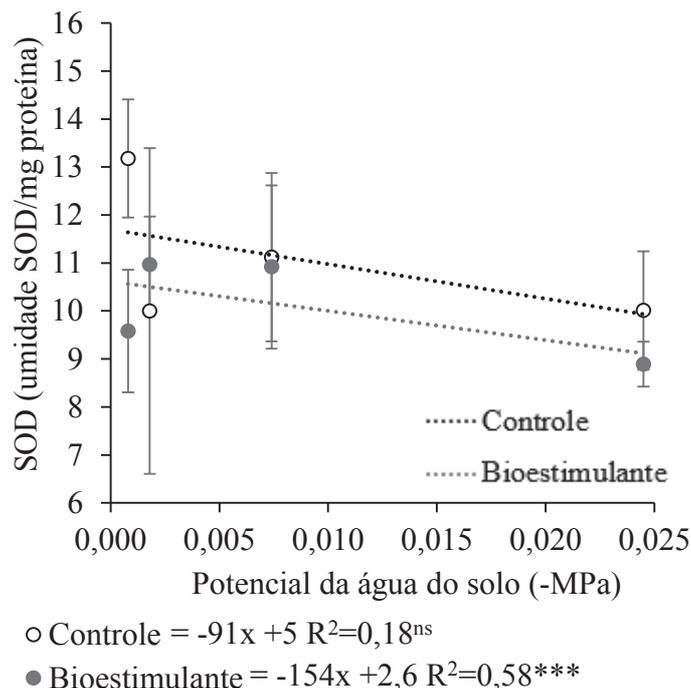
No segundo experimento, a aplicação de xenobiótico aumentou a peroxidação lipídica em plantas submetidas a potenciais baixos (-0,2286 MPa) (Figura 13B).

De acordo com a equação de regressão, um potencial da água do solo de -0,12 MPa seria responsável por um maior grau de peroxidação lipídica, quando plantas tratadas com xenobiótico.

4.9 Superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), no primeiro experimento, foi reduzida nas plantas submetidas ao déficit de água mais severo (Figura 14). Plantas tratadas com bioestimulante tiveram a atividade desta enzima reduzida.

Figura 14 - Atividade da superóxido dismutase em plantas de de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

Nota: As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

4.10 Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT), no primeiro experimento, assim como a SOD também foi reduzida pela aplicação de bioestimulante, sendo esta redução de mais de 50% (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade da catalase em plantas de de soja submetidas a aplicação de bioestimulante.

Bioestimulante	CAT (mmol/mg proteína/min)
SEM	0,197 A
COM	0,093 B

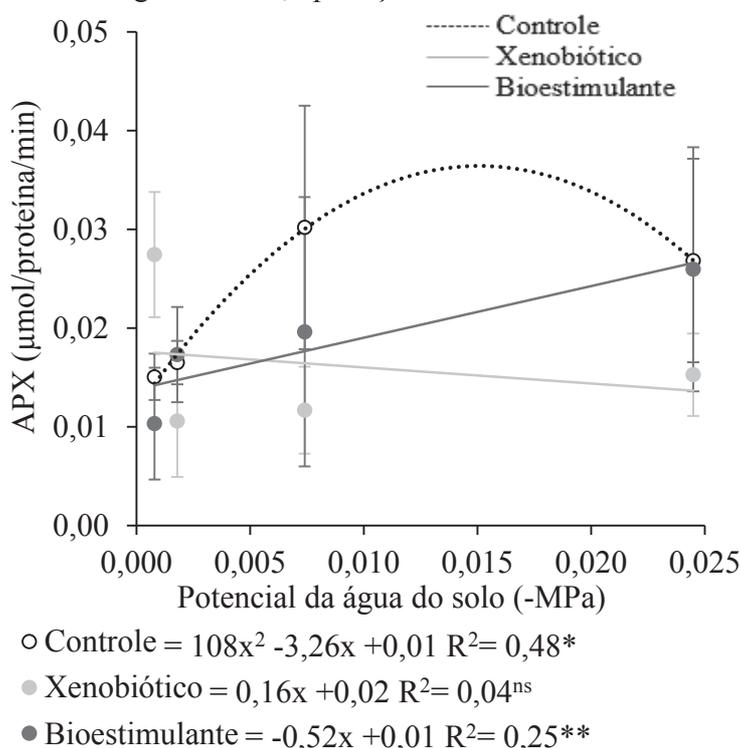
Fonte: Dados do autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa na coluna, a 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

4.11 Ascorbato peroxidase

Nos potenciais da água do solo de -0,0245, -0,0074 e 0,0018 MPa, a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi menor nas plantas que receberam a aplicação de xenobiótico (Figura 15). As plantas tratadas com bioestimulante apresentaram aumento de 0,52 $\mu\text{mol/proteína/min}$ a cada -1MPa de potencial da água do solo.

Figura 15 - Atividade da ascorbato peroxidase em plantas de de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.



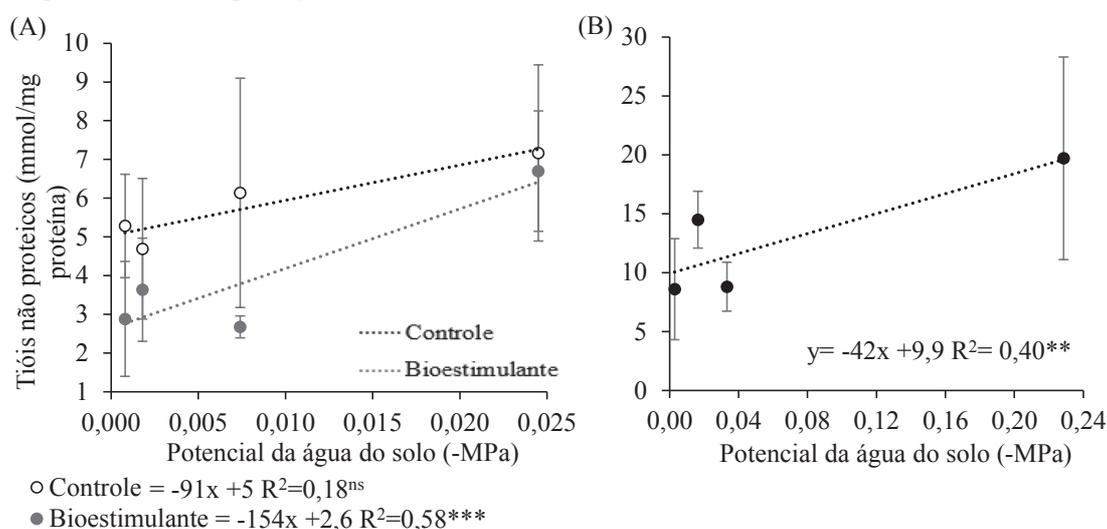
Fonte: Dados do autor.

Nota: As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * ** *** Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

4.12 Tióis não proteicos

Os maiores valores de tióis não proteicos, no primeiro experimento, foram observados nas plantas sob menor disponibilidade de água (Figura 16A). A aplicação de bioestimulante apresentou relação linear, sendo verificados aumentos de 154 mmol/mg proteína a cada -1 MPa de potencial da água no solo, e diferiu das plantas do controle apenas no potencial -0,0074 MPa.

Figura 16 - Tióis não proteicos em plantas de de soja submetidas a diferentes potenciais da água do solo e aplicação de bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

Nota: Tióis não proteicos das plantas no primeiro (A) e segundo (B) experimento. As barras verticais representam \pm o desvio padrão das amostras. * * * * * Modelos significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

No segundo experimento, apenas o potencial da água do solo foi significativo, e conforme este diminui -1MPa, resulta em um aumento de 42 mmol/mg proteína no conteúdo de tióis não proteicos (Figura 16B).

4.13 Estimativas modelos de regressão

A partir dos modelos de regressão gerados pelas variáveis foram estimados valores para algumas variáveis quando tratadas com xenobiótico ou xenobiótico + bioestimulante. Estes valores mostram que a adição do bioestimulante proporcionou a

redução de 1,25 °C na temperatura da folha quando plantas de soja são expostas a potenciais da água de -0,8 a -0,9 MPa (Figura 22A).

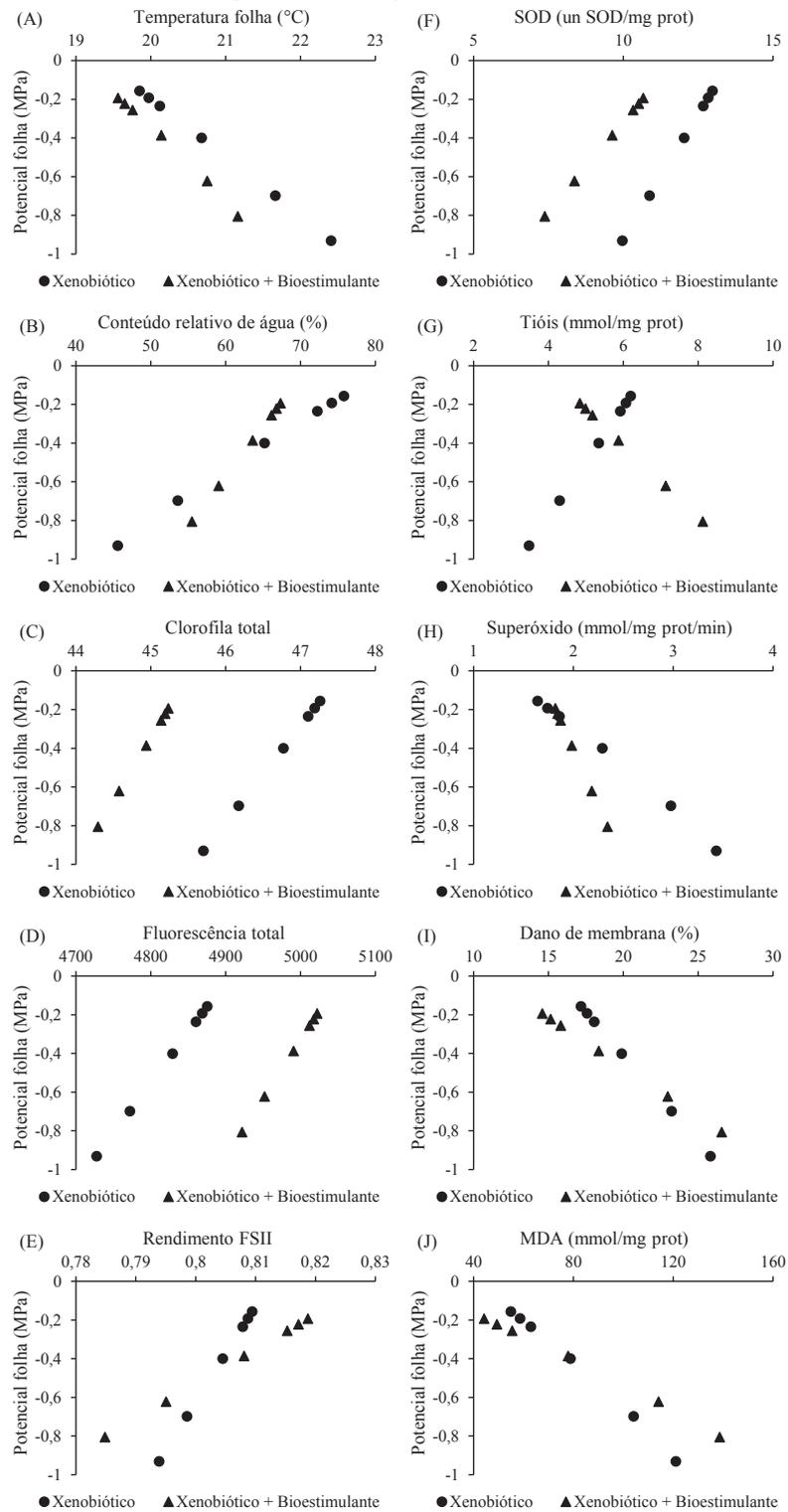
Já o conteúdo relativo de água das plantas submetidas a oito dias de déficit hídrico aumentou em aproximadamente 10% quando aplicado o bioestimulante + xenobiótico (Figura 22 B). Enquanto que, a clorofila total foi reduzida, em média, 1,81 pela adição do bioestimulante, para qualquer dos potenciais da água do solo avaliados (Figura 22C).

A fluorescência total foi praticamente 4% menor nas plantas tratadas com xenobiótico, em todos os potenciais testados, em comparação com o xenobiótico + bioestimulante (Figura 22D). O rendimento quântico do FSII apresentou variações nos diferentes potenciais (Figura 22E). Foi maior para a aplicação de xenobiótico + bioestimulante até o potencial da folha de -0,4 MPa.

A atividade da enzima SOD, na média dos potenciais da água do solo, foi 20% maior para o tratamento com xenobiótico, comparado com o xenobiótico + bioestimulante (Figura 22F). Estando de acordo com este resultado, visualizou-se também que a produção de superóxido foi maior para o xenobiótico nos menores potenciais da folha, tendo sido semelhante ao tratamento com bioestimulante combinado em potenciais da água da folha mais altos (Figura 22H).

Em condições de menor disponibilidade de água, foram estimados maiores valores de tióis para o tratamento de xenobiótico + bioestimulante (Figura 22G). O conteúdo de MDA e o dano de membrana foram superiores para o tratamento isolado de xenobiótico até o potencial da água da folha de -0,4 MPa (Figura 22I e 22J). A partir de -0,7 MPa de potencial da água da folha essa situação se inverteu, tendo portanto a adição de bioestimulante contribuído para a geração de dano em plantas com menor disponibilidade de água.

Figura 17 - Estimativas dos modelos de regressão para temperatura da folha, conteúdo relativo de água, clorofila total, fluorescência da clorofila, rendimento quântico do FSII, atividade da SOD, concentração de $O_2^{\cdot-}$, conteúdo de tióis não-proteicos, conteúdo de MDA e dano de membrana em plantas de soja tratadas com xenobiótico e bioestimulante.



Fonte: Dados do autor.

4.14 Correlações

Clorofila *a*, *b* e total correlacionaram-se positivamente entre si e com o conteúdo relativo de água, o rendimento quântico do FSII, e a atividade da APX, e negativamente com o dano de membrana (Tabela 4). O potencial da água da folha correlacionou-se negativamente com temperatura, H₂O₂, O₂^{•-}, dano de membrana, conteúdo de MDA, atividade da APX e tióis não proteicos.

O conteúdo relativo de água correlacionou-se com todas as demais variáveis, exceto fluorescência total, e atividade da CAT. As correlações negativas foram com a temperatura, conteúdos de H₂O₂ e O₂^{•-}, dano de membrana, conteúdo de MDA, atividade da APX e tióis não proteicos.

O dano de membrana e o conteúdo de MDA correlacionaram-se positivamente entre si e com a temperatura, o conteúdo de O₂^{•-}, a atividade da enzima APX e com os tióis não proteicos.

A atividade da CAT correlacionou-se positivamente com o H₂O₂, o O₂^{•-}, o conteúdo de MDA e os tióis não proteicos, e não se correlacionou negativamente com nenhuma das demais variáveis.

Os maiores coeficientes de correlação de Pearson positivos foram observados entre a clorofila total e clorofila *a* (0,94), o conteúdo relativo de água e o potencial da água da folha (0,92), a clorofila *b* e total (0,79), o conteúdo de MDA e o O₂^{•-} (0,75), e o O₂^{•-} e os tióis não proteicos (0,72). Enquanto que os negativos foram entre o potencial da água da folha e o dano de membrana (-0,88).

Tabela 4 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis avaliadas em plantas de soja submetidas à diferentes potenciais da água do solo, aplicações de xenobiótico e bioestimulante.

	Cl a	Cl b	Cl total	Pot Folha	Cont H $_2$ O	Condut	Temp	Rend FSII	Ft	H $_2$ O $_2$	O $_2^{\cdot-}$	Dano	MDA	CAT	SOD	APX	Tióis
Cl a	1	0,53***	0,94***	-0,06 ^{ns}	0,26***	0,20 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,25**	0,08 ^{ns}	0,34***	-0,34***	-0,36***	-0,39***	0,13 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,34**	-0,32***
Cl b		1	0,79***	0,21 ^{ns}	0,42***	0,33**	0,20*	0,17*	-0,32***	-0,10 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,27***	-0,09 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,26*	-0,07 ^{ns}
Cl total			1	0,05 ^{ns}	0,36***	0,29**	0,04 ^{ns}	0,25**	-0,07 ^{ns}	0,21**	-0,23**	-0,37***	-0,32***	0,08 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,33**	-0,26**
Pot Folha				1	0,92***	.	-0,48***	0,28**	0,27*	-0,71***	-0,28*	-0,88***	-0,53***	-0,20 ^{ns}	0,42***	-0,27*	-0,63***
Cont H $_2$ O					1	0,68***	-0,40***	0,59***	-0,03 ^{ns}	-0,31***	-0,27***	-0,81***	-0,40***	-0,15 ^{ns}	0,44***	-0,25*	-0,49***
Condut						1	-0,38*	0,30**	-0,20 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,48***	-0,21 ^{ns}	.	.	.	-0,27*
Temp							1	-0,01 ^{ns}	-0,49***	0,18*	0,42***	0,32***	0,37***	0,17 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,42***	0,30***
Rend FSII								1	-0,08 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-0,24**	-0,76***	-0,21**	0,11 ^{ns}	0,39***	0,29**	-0,61***
Ft									1	-0,01 ^{ns}	-0,61***	-0,06 ^{ns}	-0,45***	-0,21 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,46***	-0,35***
H $_2$ O $_2$										1	0,14 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,29**	-0,12 ^{ns}	0,32**	0,11 ^{ns}
O $_2^{\cdot-}$											1	0,38***	0,75***	0,38***	0,16 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,72***
Dano												1	0,43***	0,11 ^{ns}	-0,41***	0,29**	0,69***
MDA													1	0,32**	-0,10 ^{ns}	0,33**	0,57***
CAT														1	0,12 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,37***
SOD															1	-0,07 ^{ns}	0,05 ^{ns}
APX																1	0,34**
Tióis																	1

Fonte: Dados do autor.

Nota: * ** *** Significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente. Cl a : Clorofila a ; Cl b : Clorofila b ; Cl total: Clorofila total; Pot Folha: Potencial da água da folha; Cont H $_2$ O: Conteúdo relativo de água; Cond: Condutância estomática; Temp: Temperatura da folha; Rend FSII: Rendimento quântico do FSII; Ft: Fluorescência total da clorofila; H $_2$ O $_2$: Peróxido de hidrogênio; O $_2^{\cdot-}$: Superóxido; Dano: Dano de membrana; MDA: Conteúdo de MDA; CAT: Catalase; SOD: Superóxido dismutase; APX: Ascorbato peroxidase; Tióis: Tióis não proteicos.

DISCUSSÃO

Plantas expostas à menores disponibilidades de água tiveram o *status* hídrico reduzido, sendo diminuídos o potencial da água da folha das plantas, o conteúdo relativo de água e a condutância estomática. Essas alterações corroboram com o estudo de Javadi et al. (2017), e podem ser decorrentes das mudanças na pressão osmótica causadas pela falta de água, ou ainda pela absorção dificultada de água pelas raízes (Javadi et al., 2017).

Neste trabalho foi possível observar que plantas de soja com irrigação cortada durante oito dias atingiram um potencial da água na folha de -0,913 MPa, o qual é bem menor (-0,3 MPa) que o atingido por plantas de batata em déficit de água (KATERJI, 1990), mostrando que esse período sem irrigação pode ser considerado um estresse bastante severo. Em temperatura média de 26 °C, Jumrani; Bhatia (2018) mostraram que com 17 dias de restrição de água, plantas de soja no estágio vegetativo, alcançaram o potencial da água da folha de -2,5 MPa. Esse tempo foi diminuído para oito dias, no estágio reprodutivo.

Plantas de soja sob 80% da capacidade de campo apresentaram valores de -0,38 MPa, e quando a capacidade de campo foi diminuída para 40% o potencial da água da folha alcançou -1,02 MPa (GHOSH et al., 2000). Além deste trabalho outros estudos também mostraram existir essa relação de diminuição de potencial de água em condições de restrição hídrica (MAKBUL et al., 2011; KHAN et al., 2015; CHOUDHURY et al., 2017), podendo essa diminuição ser maior que 15% (KHAN et al., 2015). Para a cultura do milho, que é uma C4, e portanto, considerada mais resistente à falta de água, valores de potencial da água entre -1,2 e -1,5 MPa são considerados críticos, podendo ser usados como indicativos de déficit (BERGONCI et al., 2000).

Os valores estimados neste trabalho também permitiram prever valores que poderiam ser considerados críticos para algumas variáveis quando plantas da espécie testada, em ambiente protegido, neste estágio de desenvolvimento fossem expostas a um

estresse severo de limitação de água durante seis dias, combinada com a aplicação de xenobiótico. Esse período de restrição hídrica acarretou em um potencial de água do solo de -0,0245 MPa e da folha de -0,9 MPa.

A condutância estomática diminuída nos potenciais da água do solo mais negativos diminuiu as trocas entre as plantas e o ar, o que pode ter contribuído na diminuição da absorção de CO₂. Esta diminuição na condutância favoreceu ainda o aumento na temperatura foliar destas plantas. Isto porque as plantas sob baixos potenciais da água do solo fecharam estômatos para, através da regulação da transpiração, evitar a perda de água, na tentativa de manter o turgor das células, e regular o fluxo de CO₂ (TAIZ et al., 2017; ZANDALINAS et al., 2018). Assim, de acordo com estes autores, o calor que seria removido das folhas, junto com a água, mediante esfriamento evaporativo acabou ficando e aumentando a temperatura foliar.

Corroborando com os resultados deste estudo, reduções na condutância estomática foram observadas em plantas submetidas à restrição hídrica (RIBAS-CARBO et al., 2005; CHAVARRIA et al., 2015; ZHANG et al., 2016), podendo ser reduções progressivas, e que chegaram a 40% (MAKBUL et al., 2011). Condutâncias estomáticas menores que 0,2 mol/m²/s resultaram em decréscimos das taxas de respiração (GALMÉS et al., 2007). Correlação positiva foi encontrada entre a condutância estomática e o conteúdo relativo de água, corroborando com os resultados de Du et al. (2012). Isso mostra que quanto melhor a condição hídrica da planta, maiores as trocas gasosas realizadas por esta.

Essas reduções no *status* hídrico da planta foram responsáveis também pela diminuição no conteúdo de clorofila total, resultado que também foi observado por Makbul et al. (2011). Estes autores encontraram valores de potencial da água da folha de -0,88 MPa para as plantas do controle e -1,18 MPa para plantas de soja 10 dias sem irrigação.

Reduções na clorofila podem ser decorrentes da menor fotossíntese das plantas. Chavarria et al. (2015) observaram reduções na atividade fotossintética de plantas de soja quando estas foram submetidas a potenciais da água do solo menores de -0,026 MPa.

Enquanto que plantas de girassol sob restrição de água apenas começaram a apresentar diminuições na taxa fotossintética quando expostas a potenciais da água do solo menores de -0,8 MPa, e atingiram um limiar crítico de quase 90% de inibição da fotossíntese em -1,8 MPa (ORTIZ-LOPEZ; ORT; BOYER, 1991). Esse efeito na atividade fotossintética, apresentado antecipadamente por uma planta C3, soja, pode ser decorrente da maior sensibilidade que essas plantas apresentam com relação ao déficit hídrico, com relação à plantas C4, que possuem maior manutenção do turgor das células, e maior capacidade contra danos oxidativos causados pelo estresse (NAYYAR; GUPTA, 2006).

A aplicação de xenobiótico resultou no menor potencial da água da folha, -0,98 MPa, tendo, no entanto, não diferido dos demais tratamentos. Este potencial foi aumentado pela adição do bioestimulante na aplicação, tanto para valores medidos, como para os estimados, o qual mostrou-se importante na manutenção do *status* hídrico da planta. A aplicação de ácidos fúlvicos em plantas de milho também contribuiu para melhorar o *status* hídrico destas plantas, o qual havia reduzido sob baixas disponibilidades hídricas (ANJUM et al., 2011).

Apesar da literatura mostrar uma maior absorção de água devido ao crescimento mais vigoroso e maior condutância hidráulica das raízes, em plantas que recebem a aplicação de bioestimulante (LI et al., 2005), neste trabalho o bioestimulante não apresentou muito efeito no conteúdo relativo de água destas plantas.

A amenização do estresse pela aplicação de bioestimulante também pode estar relacionado com a composição deste bioestimulante. Ele possui folcisteína, a qual é formada por ácido fólico + cisteína (aminoácido). Neste sentido, o elemento enxofre, para ser assimilado pela planta precisa ser reduzido a sulfato e cisteína, e dentre as etapas para essa redução, há a necessidade de doação de elétrons, sendo a glutathione uma das possíveis doadoras (TAIZ et al., 2017). Assim, a glutathione está relacionada com a cisteína, e poderia ter aumentado sua quantidade, apesar de não ter sido possível essa visualização através do conteúdo de tióis não proteicos.

A partir das estimativas geradas pelos modelos de regressão foi possível observar um padrão de resposta onde o bioestimulante contribuiu para a manutenção do *status* hídrico da planta, mesmo quando exposta a baixa disponibilidade de água. Essa contribuição, no entanto, parece estar limitada ao potencial da água da folha de -0,7 MPa. Para essa condição, foram estimados valores de conteúdo relativo da água de 50%, temperatura da folha de 21,8 °C e rendimento do FSII de 0,78 mmol CO₂/mmol fótons, que poderiam ser indicativos de estresse.

Para a condutância estomática, a aplicação do bioestimulante apresentou efeito nas plantas com maior disponibilidade de água, onde as plantas tratadas tiveram a condutância estomática aumentada e, portanto, capacidade aumentada de trocas gasosas, assimilação de CO₂ e fotossíntese.

Entretanto, a literatura mostra que plantas de trigo sob condições de seca submetidas a aplicação de ácidos fúlvicos reduziram a condutância estomática, no sentido de evitar a perda de água, resultando em maior conteúdo relativo de água, potencial da água e conteúdo de clorofila (XUDAN, 1986). A aplicação de ácidos fúlvicos também contribuiu para proteger o aparato fotossintético de plantas de milho, e aumentar as trocas gasosas destas quando irrigadas, e sob déficit hídrico (ANJUM et al., 2011).

De acordo com Dunstone; Richards; Rawson (1988), plantas de trigo sob restrição hídrica e aplicação de ácidos fúlvicos quando conduzidas em ambiente protegido e no campo não apresentaram efeito na condutância estomática. Mas em experimentos conduzidos em câmara de crescimento, o ácido fúlvico foi efetivo na redução da condutância estomática. Portanto, estes autores concluíram que os efeitos da aplicação de bioestimulantes são variáveis, podendo depender do genótipo estudado e ainda do ambiente em que o experimento foi conduzido.

Não observamos efeito da aplicação de xenobiótico na condutância estomática, enquanto que, plantas de tomate tratadas com fungicida do grupo químico das estrobilurinas apresentaram maiores taxas de assimilação de CO₂, e condutância estomática diminuída (GIULIANI et al., 2018). Este estudo mostrou ainda que a

eficiência do uso da água foi aumentada com a utilização desse fungicida em plantas sob níveis extremos de déficit hídrico.

O trabalho conduzido mostrou não haver efeitos deletérios pela aplicação de xenobiótico em baixos potenciais da água do solo, com relação ao *status* hídrico, estando de acordo com outros estresses combinados estudados. A exposição de plantas à seca e alta temperatura combinadas resultou em maior potencial da água da folha, quando comparado com as plantas submetidas à seca isolada (SILVA et al., 2010).

Contrariamente, plantas expostas à salinidade e déficit hídrico tiveram o potencial de água diminuído, em comparação com estresses isolados (KHAN et al., 2015). Estes autores e Slama et al. (2015) também observaram decréscimos no conteúdo relativo de água, para esses estresses combinados. Plantas expostas a estresses de calor e seca também tiveram o conteúdo relativo de água reduzido, nas espécies de tomate (DUC; CSINTALAN; POSTA, 2018) e o algodão (SEKMEN et al., 2014). Provavelmente devido a necessidade da planta liberar calor, através do resfriamento evaporativo, aumentou a abertura estomática e conseqüentemente o conteúdo de água na planta foi diminuído.

Com relação a condutância estomática, plantas de *Sesuvium portulacastrum* tiveram essa variável diminuída quando expostas ao déficit hídrico isolado, comparativamente ao estresse combinado de seca e salinidade (SLAMA et al., 2015). De acordo com estes autores a exposição das plantas à salinidade pode ter aliviado alguns efeitos negativos da seca pela contribuição do sódio no ajustamento osmótico. Plantas de repolho, ao contrário, tiveram a condutância diminuída quando submetidas a estes mesmos fatores de estresse combinados (SAHIN et al., 2018).

Observamos que a baixa disponibilidade de água no solo fez com que as plantas de soja fechassem seus estômatos para evitar a perda de água por transpiração, aumentando assim a temperatura dentro da planta. Isso foi confirmado pelas correlações negativas observadas entre a condutância estomática e a temperatura das folhas, indicando que o fechamento dos estômatos, que induz à menores trocas gasosas, acarretou

em maiores temperaturas, pois sem as trocas o esfriamento evaporativo fica prejudicando (TAIZ et al., 2017).

O estresse térmico pode prejudicar o metabolismo vegetal, devido aos efeitos na estabilidade de proteínas e enzimas (TAIZ et al., 2017). Observou-se a indução das enzimas CAT e APX, com aumentos na temperatura, o que é resultado do aumento na atividade respiratória, enquanto que a SOD teve a atividade diminuída. Como estas enzimas metabólicas tem temperaturas ótimas de funcionamento diferentes (TAIZ et al., 2017), o aumento na temperatura causado pela falta de água, pode ter sido responsável por estes resultado encontrados.

Como o estresse térmico acarreta em perturbações no fluxo de elétrons e desestabilização das reações energéticas, leva à acumulação de espécies reativas de oxigênio (TAIZ et al., 2017), como foi observado neste trabalho para as plantas submetidas à baixa disponibilidade de água no solo. O efeito do aumento da temperatura foliar fez com que ocorresse o aumento da fluidez das membranas, estando relacionado com os danos que foram observados de ruptura e peroxidação dos lipídios constituintes dessas estruturas, corroborando com Farooq et al. (2009).

Aumentos expressivos na temperatura foliar, causados por déficit hídrico também foram observados em outras culturas como o algodão e o amendoim (SHAHENSHAH; ISODA, 2010). Estes autores observaram aumentos de 3,5 e 4,2 °C, para algodão e amendoim, respectivamente. Ainda, foi possível observar neste trabalho que as altas temperaturas induzidas pelo déficit hídrico influenciaram negativamente a eficiência do FSII.

Estresse por falta de água combinado com aumentos de temperatura foliar observados podem ter contribuído na degradação dos pigmentos fotossintéticos ou inclusive na alteração da biossíntese destes pigmentos, uma vez que os pigmentos fotossintéticos foram diminuídos. De acordo com Aghaie et al. (2018), estes fatores citados são considerados a principal causa da redução dos pigmentos em situações de estresse.

A deterioração da estrutura dos cloroplastos, e conseqüente redução da clorofila podem ser causadas pelo estresse oxidativo decorrente do déficit hídrico nas plantas, fatores que podem acarretar em diminuição da atividade fotossintética. Apesar disto, plantas de soja expostas a potenciais da água do solo de até -0,164 MPa não tiveram variações nos conteúdos de clorofila *a*, *b* e total, enquanto que a atividade fotossintética já apresentou diminuições com -0,026 MPa (CHAVARRIA et al., 2015).

No entanto, outros trabalhos mostraram haver reduções nos conteúdos de clorofila em plantas submetidas a déficit hídrico (MASOUMI et al., 2010; MAKBUL et al., 2011; CHEN et al., 2016; JAVADI et al., 2017). Observou-se ainda existência de correlações negativas dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e clorofila total) com o $O_2^{\cdot-}$, o que segundo Gill; Tuteja (2010), pode ser explicado pelo fato de espécies reativas de oxigênio serem capazes de induzir danos aos pigmentos.

Os pigmentos fotossintéticos das folhas foram reduzidos também pela aplicação de xenobiótico, o que pode acarretar em menor absorção de fótons por estas moléculas, e conseqüentemente diminuir a absorção de luz. Este resultado corrobora com Saladin; Magné; Clément (2003) e Stiborová et al. (1986), que mostraram que aplicações de fludioxonil e fungicida a base de cobre, respectivamente, resultaram em reduções na síntese e no conteúdo de clorofila das plantas. Plantas de alface tratadas com mancozeb também tiveram o conteúdo de clorofila *a* e *b* reduzido, 7 dias após o tratamento (DIAS et al., 2014).

Resultados diferentes foram encontrados para a aplicação de Kresoxim-methyl em plantas de trigo (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; GASPAR, 1999), e ainda para Fox[®] e outros fungicidas na cultura da soja (ZAMBIAZZI et al., 2018). Estes autores encontraram efeitos fisiológicos positivos decorrentes da aplicação de fungicida, sendo observados incrementos significativos no conteúdo de clorofila de plantas de soja. Importante ressaltar que as medições de clorofila foram realizadas sete dias após a aplicação do fungicida, enquanto que neste trabalho, foram realizadas menos de 12 horas depois da aplicação, o que pode ter contribuído para a obtenção de resultados distintos.

O aumento de clorofila favorecido pela aplicação de bioestimulante, no segundo experimento, pode ter sido devido à sua composição, uma vez que tem em sua formulação, o nitrogênio. Este pode estimular a planta a translocar o nitrogênio existente, que é um elemento mineral constituinte de componentes celulares, como aminoácidos e clorofila (TAIZ et al., 2017). De acordo com Ali; Hassan (2013), os aminoácidos presentes nestes produtos auxiliam na absorção e transporte dos nutrientes para o interior da planta, pois possuem ação sobre a permeabilidade.

Este efeito nos pigmentos pode ter contribuído para a melhora da atividade fotossintética destas plantas sob déficit hídrico. De acordo com Ertani et al. (2009), a assimilação de nitrogênio pode ser estimulada com a atividade aumentada de enzimas, como a nitrato redutase e a glutamina sintetase, as quais fazem parte de um mecanismo que pode ser desencadeado a partir da aplicação de bioestimulantes.

Outro aspecto a ser considerado a respeito da composição do bioestimulante, o qual por conter nitrogênio e outros compostos, pode ser responsável por aumentar o metabolismo da planta, e assim, quando este for aplicado combinado com o xenobiótico, numa condição de déficit hídrico, efeitos de fitotoxidez poderão ser potencializados.

Para Marques (2014), a fitotoxidez foi diminuída quando plantas de trigo receberam a aplicação de fungicida com fertilizante foliar. Esses autores utilizaram a clorofila como indicativo de toxicidade nos tecidos, uma vez que ela é capaz de indicar o estado metabólico celular (KHOSRAVINEJAD; HEYDARI; FARBOODNIA, 2008).

Assim como se observou neste trabalho para efeito combinado de déficit hídrico e aplicação de fungicida, estresses combinados de seca e salinidade mostraram ser responsáveis pelo aumento do efeito negativo no conteúdo de clorofila das plantas (MANUCHEHRI; SALEHI, 2014).

O rendimento quântico do fotossistema II (FSII) também foi afetado pela restrição hídrica, sendo que as plantas com restrição hídrica de oito dias (-0,2286 MPa) apresentaram um rendimento quântico inferior a 0,75 mmol CO₂/mmol fótons, que é

considerado como limite crítico, abaixo do qual as plantas podem sofrer danos ao FSII (SUASSUNA et al., 2011).

A redução no rendimento quântico do FSII resulta da diminuição na eficiência em que os centros de reação do FSII capturam a energia (ZHANG et al., 2016). Um trabalho conduzido por estes autores, que submeteu plantas de soja à condições estressantes de falta de água, mostrou que estas reduziram o rendimento quântico do FSII, mas esta diminuição não mostrou diferença estatística em comparação com as plantas submetidas a alta disponibilidade de água.

A aplicação de xenobiótico, concomitante com bioestimulante, em condições de déficit hídrico contribuiu para reduzir o rendimento quântico do FSII, assim como estresses combinados de seca e calor reduziram essa variável em plantas de algodão (SEKMEN et al., 2014).

Para os dados estimados pelos modelos de regressão, a adição do bioestimulante na aplicação de fungicida estaria limitada a -0,7 MPa, pois o rendimento quântico do FSII, que vinha sendo maior nos demais potenciais inverteu o seu comportamento neste potencial e nos próximos e passou a ser menor quando comparado as plantas tratadas com xenobiótico.

A fluorescência da clorofila aumentada pela aplicação dos produtos indica alterações na atividade fotossintética (BAKER; ROSENQVIST, 2004), sendo um indicativo de maior foto inibição, e consequentes danos físicos ao FSII. Esses danos provavelmente foram evitados pela ação do bioestimulante, uma vez que plantas sob menores disponibilidades de água, tiveram a fluorescência diminuída com relação ao controle, em resposta à melhora na condição hídrica proporcionada pelo produto. Isto pode ser decorrente também da composição do bioestimulante, a qual pode aumentar o metabolismo da planta, podendo ter gerado maior estresse nesse sentido.

Aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio, como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram observadas nas plantas sob baixas

disponibilidades hídricas do solo. A acumulação destas espécies pode ser resultante das reduções na fotossíntese líquida, desencadeadas pela limitada entrada de CO₂, em decorrência do fechamento estomático (DAS et al., 2016). Produção aumentada destas moléculas nas células pode ocasionar um desbalanço no sistema antioxidante, que poderá resultar em geração de estresse oxidativo (CRUZ de CARVALHO, 2008).

Plantas de soja sob restrição hídrica já apresentaram resposta de aumentar a produção de H₂O₂ em outros estudos (DAS et al., 2016; GULER; PEHLIVAN, 2016; WANG et al., 2016; XING et al., 2016; HAO et al., 2013), corroborando com o resultado obtido. Assim como a produção de O₂^{•-} (SHARMA; DUBEY, 2005; BIAN; JIANG, 2009; HU et al., 2010; DU et al., 2012; YANG et al., 2014; SUN et al., 2016; XING et al., 2016; NAHAR et al., 2018).

A proporção desse aumento pode variar em cada situação, dependendo da intensidade e duração do estresse, do estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra, da genética, e até mesmo do tecido avaliado (SCHNEIDER; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Assim, neste trabalho observou-se que a maior concentração de H₂O₂ foi observada para as plantas submetidas a -0,0245 MPa, no primeiro experimento, e não atingiu níveis tão nocivos quando expostas a potenciais da água do solo mais baixos, como os do segundo experimento (-0,2286 e -0,0332 MPa). Uma possível explicação para isso, é que espécies reativas como o H₂O₂, apesar de serem moléculas tóxicas a partir de um certo nível nas células, são consideradas como moléculas de sinalização de estresse (MITTLER, 2017). Assim, a exposição das plantas à falta da água desencadeou alterações no seu metabolismo, como o aumento da produção de moléculas de H₂O₂, as quais podem ter sinalizado essa situação de estresse, e dessa forma a planta induziu mecanismos de defesa, os quais eliminaram parte dessas espécies.

Observou-se também que a produção das diferentes espécies reativas em função do estresse teve comportamento diferente. Esse resultado pode ser decorrente das diferenças nos graus de reatividade das moléculas e também devido aos distintos tempos de meia vida. Além disso, diferente do que foi observado para o H₂O₂, déficits hídricos mais severos mantiveram altas concentrações de O₂^{•-}, que pode ser decorrente da menor

quantidade de sistemas de eliminação dessa espécie, em comparação com os sistemas capazes de eliminar o H₂O₂, como mostra o estudo de Mittler (2017).

Ou ainda, o fato do O₂^{•-} ter sua produção aumentada num potencial mais baixo (-0,0245 MPa), comparativamente com o H₂O₂, demonstra que essa produção antecipada de O₂^{•-} reflete na produção de H₂O₂. Isso ocorre pois, o O₂^{•-} é geralmente a primeira espécie reativa a ser gerada, sendo produzido pela redução do oxigênio durante o transporte de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons (GILL; TUTEJA, 2010), como pode ser observado na figura de Schneider; Caverzan; Chavarria (2019) (Anexo I). Portanto, na dismutação do O₂^{•-}, há a redução de dois elétrons de oxigênio, fator determinante na formação do H₂O₂ (GILL; TUTEJA, 2010).

As mudanças nos níveis de H₂O₂ nas células, podem atuar como indicadores da integridade estrutural da membrana das plantas expostas a estresse (SHAHID et al., 2018), uma vez que as membranas são, muitas vezes, o primeiro alvo dos estresses abióticos (FAROOQ et al., 2009). Neste trabalho estimamos valores para a SOD, o O₂^{•-}, o dano de membrana e o conteúdo de MDA, os quais sugerimos como indicativo dessas condições de estresse. Assim, a atividade da SOD seria 8,7 unidade SOD/mg proteína, a produção de O₂^{•-} na faixa de 3,4 mmol/mg proteína/min, o dano de membrana em 26% e o conteúdo de MDA de 130 mmol/mg proteína.

Neste sentido, os maiores danos observados nas membranas ocorreram nos potenciais da água do solo mais baixos, os quais podem ter sido decorrentes da maior produção de espécies reativas, como o H₂O₂ e O₂^{•-}. De acordo com Foyer; Lelandais; Kunert (1994), isso é explicado pois em condições de estresse, o incremento na produção de espécies reativas de oxigênio resulta em vazamento de eletrólitos, o que acarreta aumentos nos danos de membrana. Ruppenthal et al. (2016), também observaram aumento no dano de membrana em plantas de soja, quando expostas à sete dias de restrição de água, mas que foram expressivamente menores comparativamente com os percentuais observados no presente trabalho.

Outro indicativo de dano de membrana, que foi aumentado nas plantas sob baixa disponibilidade hídrica, é o conteúdo de malondialdeído (MDA), que é o último produto da peroxidação lipídica que ocorre nas membranas (SAHIN et al., 2018). Corroborando com estes resultados, outros estudos mostraram que plantas de soja submetidas a estresse hídrico tiveram o conteúdo de MDA aumentado (DEVI; GIRIDHAR, 2015; GULER; PEHLIVAN, 2016; XING et al., 2016; TANG et al., 2017).

A aplicação de bioestimulante diminuiu a concentração de espécies reativas de oxigênio nas plantas, no primeiro experimento. Isso indica que ele pode atuar até um certo nível de estresse, pois não se observou efeito no segundo experimento, quando se testou estresse mais severo por falta de água. Os valores estimados pelos modelos para os danos causados pela peroxidação lipídica (MDA) também mostraram existir um indicativo de potencial limítrofe para a aplicação de bioestimulante. Esse dano foi bem minimizado pelo bioestimulante até o potencial da água da folha de -0,4 MPa, situação também invertida no potencial -0,7 MPa.

O conteúdo de MDA apresentou correlação negativa com o conteúdo relativo de água, corroborando com o resultado de Awasthi et al. (2017). Já a concentração de H_2O_2 apresentou ausência de correlação com o conteúdo de MDA. Esse resultado também já foi observado, e pode ser devido a geração de outras espécies reativas, além do H_2O_2 , as quais são responsáveis por danos celulares, ou até mesmo a existência de um sistema antioxidante muito eficiente, capaz de eliminar o H_2O_2 (JOVANOVIĆ; MAKSIMOVIĆ; RADOVIĆ, 2011). O $O_2^{\cdot-}$ entretanto apresentou correlação positiva com o conteúdo de MDA, pelo fato do MDA ser um subproduto da peroxidação lipídica, e o $O_2^{\cdot-}$ uma espécie reativa de oxigênio, que em determinadas situações pode se tornar uma molécula tóxica, capaz de degradar os constituintes das biomembranas (ASHRAF; ASHRAF; SHAHBAZ, 2012; ASHRAF et al., 2015).

Embora não tenha sido observado neste estudo, aplicação de fungicida também resultou em diminuição dos danos às membranas, como se observou para plantas de cevada tratadas com fungicida a base de piraclostrobina (estrobilurina), as quais reduziram os danos, e portanto, apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo,

assim como maior atividade de enzimas antioxidantes (KÖEHLE et al., 2003). Essas reduções podem ter sido em resposta aos efeitos fisiológicos positivos dos fungicidas, que implicam na manutenção mais duradoura de folhas fotossinteticamente ativas, retardando a senescência, uma vez que de acordo com Zhang et al. (2010), o processo de senescência pode induzir à produção de espécies reativas de oxigênio, as quais quando se acumulam se tornam tóxicas, e causam danos.

Além disso, a ativação de mecanismos de defesa, como as enzimas antioxidantes podem ter contribuído para as menores produções dessas moléculas reativas, como se observou para fungicidas compostos por estrobilurina, os quais mostraram-se eficazes em aumentar a atividade de várias enzimas antioxidantes, e portanto, suprimir a acumulação de espécies reativas de oxigênio (WU; VON TIEDEMANN, 2002). De acordo com estes autores, em outro estudo realizado, o fungicida epoxiconazole resultou no aumento da acumulação de H_2O_2 em células de plantas de cevada, enquanto que o fungicida azoxtrobina apresentou pequenos efeitos nos níveis de H_2O_2 . Assim como fungicidas aplicados em plantas de ervilha (SHAHID et al., 2018) e trigo (ZHANG et al., 2010) que também contribuíram para aumentar as quantidades acumuladas de H_2O_2 nas células.

Já, a amenização do estresse oxidativo, visualizada pela menor produção de espécies reativas de oxigênio em plantas tratadas com bioestimulante, pode ter sido decorrente da presença da folcisteína em sua composição. Isso porque resíduos de cisteína podem reagir com o $O_2^{\cdot-}$ e com o H_2O_2 , sendo que as taxas constantes de reação variam em 7×10^5 e 1-2, respectivamente para essas duas espécies (AKTER et al., 2015; WINTERBOURN, 2015; MITTLER, 2017; SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

As espécies reativas de oxigênio interagem com diversas vias de sinalização, e sinais são transmitidos por meio de proteínas, sendo a cisteína um dos alvos destas moléculas (AKTER et al., 2015). A cisteína pode estar em vários estados de oxidação, pois contém o átomo de enxofre com muitos elétrons, fazendo com que os resíduos de cisteína sejam importantes locais de modificação (DAVIES, 2005). Sensores de transdução de sinal podem ser desvendados por estas proteínas modificadas que contém a cisteína (COUTURIER et al., 2013).

O bioestimulante apresenta em sua composição metais de transição, como o ferro, que, segundo Mittler (2017), pode contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio, via reação de Fenton. No entanto, também estão presentes íons de magnésio e manganês, os quais são fundamentais para o funcionamento da enzima superóxido dismutase (GILL; TUTEJA, 2010), que atua na eliminação das espécies quando em níveis tóxicos. Representa-se que, neste trabalho maior foi a ação de constituintes do bioestimulante benéficos às plantas, pois as espécies reativas foram diminuídas, e assim também foi possível diminuir a atividade das enzimas antioxidantes nestas plantas, o que pode ter resultado em economia de energia por estas.

Assim, o bioestimulante pode ter sido fundamental para a sinalização do estresse por parte das espécies reativas de oxigênio, o que pode ter contribuído para o incremento da atividade antioxidante, e redução da produção e efeitos nocivos das espécies reativas. Embora estudos como o de Forman; Maiorino; Ursini (2010) reconhecem apenas o H_2O_2 como um mensageiro secundário, considerando o $O_2^{\cdot-}$ apenas como precursor de H_2O_2 e não um participante direto na sinalização.

Estudos como o de Xing et al (2016), ao expor plantas de soja tratadas com auxina sintética à restrição hídrica também observaram diminuições nos níveis de MDA, e conseqüentemente nos danos, sugerindo a proteção dessas plantas pelo produto contra os danos oxidativos. Assim, Tang et al. (2017) também observou reduções no conteúdo de MDA, em plantas de soja expostas à seca e tratadas com ácido salicílico.

Observamos ainda, que o déficit hídrico e a aplicação de fungicida combinados aumentaram a produção de H_2O_2 , quando avaliados visualmente, pela técnica da detecção. Outros trabalhos que utilizaram esta técnica mostraram baixa produção de H_2O_2 quando folhas de plantas em condições fisiológicas normais foram avaliadas, comparativamente com plantas estressadas com Alumínio (AWASTHI et al., 2017). Estresse salino também demonstrou ser responsável por maiores acúmulos de H_2O_2 , avaliados visualmente (JOVANOVIĆ; MAKSIMOVIĆ; RADOVIĆ, 2011; MELLIDOU et al., 2016).

Combinações de estresses de seca e radiação ultravioleta resultaram em aumentos na concentração de H_2O_2 , em plântulas de soja (SHEN et al., 2010). Este resultado também foi observado em plantas de tomate expostas a estresses combinados de calor e seca (DUC; CSINTALAN; POSTA, 2018). Plantas de algodão sob a combinação de seca e calor tiveram semelhantes produções de H_2O_2 para a combinação de estresses e seca isolada, no entanto o estresse por calor resultou na menor produção desta espécie reativa (SEKMEN et al., 2014).

Assim como o H_2O_2 foi aumentado em estresses combinados, o conteúdo de MDA também aumentou. Uma vez que maiores conteúdos de MDA representam danos oxidativos que podem ser causados pelas espécies reativas, a aplicação de fungicida em plantas submetidas a potenciais da água do solo muito baixos, pode ocasionar a geração de estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram encontrados para plantas de citrus expostas a estresse combinado de seca e alta temperatura (ZANDALINAS et al., 2017).

Maior acúmulo de MDA, e portanto maiores danos oxidativos também foram observados em plantas expostas a estresses combinados de calor e seca, quando comparados a estresses isolados, para as espécies *Jatropha curcas* (SILVA et al., 2010), tomate (DUC; CSINTALAN; POSTA, 2018) e *Cenchrus ciliaris* L. (TOMMASINO et al., 2018). Enquanto que, para o algodão, o conteúdo de MDA não diferiu para essa combinação de estresses e para a seca isolada, sendo menores danos encontrados para o estresse isolado de calor (SEKMEN et al., 2014).

Numa tentativa de combater as espécies reativas de oxigênio geradas nas condições de baixa disponibilidade hídrica do solo, as plantas ativaram os seus mecanismos antioxidantes de defesa. Estes são considerados estratégias adaptativas muito importantes para minimizar os danos oxidativos, e são constituídos pelas enzimas e pelos compostos não enzimáticos (GILL; TUTEJA, 2010; GULER; PEHLIVAN, 2016; MITTLER, 2017). Assim, maiores atividades da superóxido dismutase (SOD) foram observadas no potencial da água do solo -0,0018 MPa, as quais coincidiram com menores concentrações de $O_2^{\cdot-}$, neste mesmo potencial, uma vez que, de acordo com Wang et al. (2018), esta é a principal linha de defesa desta espécie específica. Esta enzima é

considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas, e está localizada em vários compartimentos celulares, atuando principalmente na defesa de $O_2^{\cdot-}$, e sua dismutação é catalisada em H_2O_2 e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010; XING et al., 2016). Isto pode explicar porque no estresse mais severo, não foram encontradas as maiores atividades. Pois assim que a planta sinalizou o estresse, a SOD pode ter sido acionada, e a presença de maiores concentrações de espécies reativas pode ter aos poucos reduzido sua eficiência.

Já a atividade da catalase (CAT) foi superior no potencial -0,0076 MPa, e mostrou um aumento significativo no -0,0245 MPa para plantas tratadas com fungicida, demonstrando atuar na rota de defesa do H_2O_2 (MHAMDI; BREUSEGEN, 2018), pois neste potencial foi gerado alto conteúdo de H_2O_2 , o qual diminuiu em estresses mais severos (-0,0332 e -0,2286 MPa). Esse conteúdo de H_2O_2 estimado no potencial -0,0245 MPa, de 0,83 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína pode ser, portanto, a partir deste estudo, sugerido como um patamar limítrofe. Este valor poderia ser considerado para separar o que seria um nível basal de H_2O_2 , que é essencial e positivo para a planta, de um nível que poderia ser considerado crítico, capaz de causar danos, e que por isso foi sinalizado e neutralizado, dentre uma das formas, pela atividade da CAT.

Assim como foi observado para a CAT, a atividade da ascorbato peroxidase (APX) também foi aumentada, provavelmente em consequência da maior produção de H_2O_2 , sendo esse aumento mais significativo observado no potencial da água do solo de -0,0245 MPa. A APX é considerada uma linha de defesa atuante na neutralização da produção excessiva e possíveis efeitos negativos do H_2O_2 (MHAMDI; BREUSEGEN, 2018).

Plantas de soja sob estresse hídrico já mostraram incrementos na atividade da SOD (HAO et al., 2013; DEVI; GIRIDHAR, 2015; GULER; PEHLIVAN, 2016; XING et al., 2016; TANG et al., 2017), enquanto que plantas de cevada tratadas com fungicida não apresentaram efeito (WU; VON TIEDMANN, 2002). A atividade da enzima CAT também apresentou aumento em plantas sob déficit hídrico (HAO et al., 2013; DEVI; GIRIDHAR, 2015; GULER; PEHLIVAN, 2016; XING et al. 2016; TANG et al., 2017; XU et al., 2017). Aumentos expressivos também foram observados para a atividade da

APX em plantas submetidas a déficits hídricos, os quais variaram de 25 a 190% (KAUSAR et al.; 2012; HAO et al., 2013; DEVI; GIRIDHAR, 2015; GULER; PEHLIVAN, 2016; MOLOI; MWENYE; van der MERWE, 2016; WANG et al., 2016).

Observamos a inexistência de correlação entre SOD e CAT, e também entre estas enzimas e a clorofila total, no entanto outro estudo em que plantas de soja foram expostas à déficit hídrico resultou em correlações positivas entre a atividade destas enzimas, e também com a clorofila total (MASOUMI et al., 2010).

Plantas de tomate expostas à seca apresentaram fortes correlações entre a atividade da enzima SOD e variáveis fisiológicas, como o conteúdo relativo de água, conteúdo de MDA e pigmentos fotossintéticos, enquanto que as enzimas CAT e APX não apresentaram o mesmo resultado (AGHAIE et al., 2018). Curiosamente, o presente trabalho mostrou existir correlações destas variáveis fisiológicas citadas, mas com a enzima APX, enquanto que SOD correlacionou-se positivamente apenas com conteúdo de água e potencial da água da folha, e a CAT com MDA.

De acordo com Pandey; Ramegowda; Senthil-Kumar (2015), enzimas como a CAT e a glutathiona peroxidase, por exemplo, são induzidas em uma situação de estresse hídrico. Já para estresses combinados outras rotas de defesa podem ser acionadas, como a glutathiona redutase (GR) e ainda a glutathiona-S-transferase. No entanto, este trabalho mostrou existir maior atividade de CAT em baixas disponibilidades hídricas combinadas com o xenobiótico, corroborando com o trabalho de Shen et al. (2010), em que a atividade da CAT foi aumentada em estresses combinados de seca e radiação ultravioleta. No trabalho de Wu; Von Tiedmann (2002) plantas tratadas com os fungicidas azoxystrobin e epoxiconazole também aumentaram a atividade da enzima CAT.

No entanto, outros estudos que combinaram diferentes estresses mostraram poucos efeitos na atividade desta enzima, em comparação com os estresses isolados (ISLAM et al., 2016; ZANDALINAS et al., 2017). No trabalho de Sekmen et al. (2014), plantas de algodão tiveram maiores atividades da CAT em déficit hídrico isolado, do que quando este estresse foi combinado com alta temperatura. As enzimas APX e GR são

consideradas enzimas antioxidantes chaves no ciclo da ascorbato-glutationa. (WU; VON TIEDMANN, 2002). De acordo com estes autores, a atividade da APX também foi aumentada em plantas tratadas com fungicida, assim como se observou neste estudo para as plantas submetidas ao potencial -0,0008 MPa.

Estresses combinados de seca e salinidade induziram o aumento da atividade desta enzima (MANUCHEHRI; SALEHI, 2014). Já estresses de alta temperatura e seca combinados apresentaram menor atividade da APX quando comparado com seca isoladamente (SEKMEN et al., 2014).

A aplicação de bioestimulante reduziu a enzima CAT nos diferentes potenciais da água do solo, e a enzima SOD no potencial -0,0008 MPa. Diminuições na atividade da CAT também haviam sido demonstradas em plantas submetidas a duas composições diferentes de bioestimulante (VASCONCELOS et al., 2009). De acordo com estes autores, componentes variados como substâncias húmicas, aminoácidos, matéria orgânica devem estar presentes em um bioestimulante para que este possa atuar na atenuação ao estresse.

Assim como foi observado para as enzimas, os compostos antioxidantes não-enzimáticos, avaliados neste trabalho a partir do conteúdo de tióis não proteicos, que representam predominantemente a glutathione (GSH) (NOCTOR; FOYER, 1998), foram aumentados nos potenciais da água mais baixos.

De acordo com estes autores, a GSH é formada pela enzima glutathione reductase, que utiliza $\text{NADPH} + \text{H}^+$ para reduzir a glutathione oxidada em GSH, a qual atua reduzindo diretamente as espécies reativas de oxigênio. A glutathione é encontrada principalmente em cloroplastos, mas também em outros compartimentos celulares, e atua removendo espécies reativas de oxigênio como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o radical hidroxila (NOCTOR; FOYER, 1998).

Esse pode ter sido o motivo pelo qual em potenciais da água do solo mais baixos foram encontrados maiores conteúdos de tióis, pois a planta aumentou esse antioxidante

para se proteger do estresse. A glutathiona é acumulada nas células para proteger a planta de efeitos destrutivos que podem ser causados por fatores de estresse, portanto maiores níveis de glutathiona indicam uma maior resistência ao estresse (NAHAR et al., 2018). Assim como neste estudo, outros trabalhos que submeteram plantas à déficit hídrico observaram aumentos nos níveis de glutathiona (WANG et al., 2016; HASANUZZAMAN et al., 2018; NAHAR et al., 2018).

5 CONCLUSÕES

Plantas de soja submetidas à baixos potenciais da água do solo, em ambiente protegido, com restrição de água durante seis e oito dias, são submetidas a estresse oxidativo, pela produção incrementada de espécies reativas de oxigênio, danos celulares e moleculares, e indução do metabolismo antioxidante de defesa. Além disso, apresentam alterações fisiológicas, como a diminuição de troca de gases, do *status* hídrico e da eficiência fotossintética.

A aplicação de xenobiótico também causa alterações, mas com menor intensidade. Efeitos negativos são mais pronunciados quando a aplicação ocorre em plantas submetidas à condição de baixa disponibilidade de água do solo. Isso indica que as respostas desencadeadas para os estresses isolados, a soma destes e quando em combinação é diferente. Respostas interativas negativas são observadas para essa combinação de estresses, tendo a restrição de água o efeito mais deletério.

A aplicação de bioestimulante é favorável para a amenizar os efeitos do déficit hídrico e do xenobiótico. Algumas situações mostram que o xenobiótico pode influenciar a ação do bioestimulante se aplicados concomitantemente.

A aplicação de fungicida combinada com bioestimulante, em plantas de soja em ambiente protegido, no estágio vegetativo é indicada para restrição de água de até quatro

ou seis dias, ou potencial da água do solo de -0,0074 ou -0,0164 MPa, e potencial da água da folha de -0,7 MPa, sendo não indicada após esses patamares pelo reduzido *status* hídrico da planta, trocas gasosas limitadas pelo fechamento estomático, pela geração de estresse oxidativo, e pelos danos causados às plantas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Corroborando com outros estudos de combinações de estresses, esse trabalho mostrou que a exposição simultânea ao déficit de água e xenobiótico pode induzir a novos mecanismos de defesa e respostas diferenciais a um novo tipo de estresse, e não apenas a soma das respostas de cada um destes estresses isolados.

Mecanismos diferentes de tolerância a esta situação de estresse combinado podem ter sido desencadeadas, os quais demandam estudos para serem desvendados e entendidos, pois é uma situação que vem sendo encontrada com frequência.

Neste sentido, são necessários avanços com o propósito de compreender as situações, cada vez mais diversas, enfrentadas pelas plantas no campo. Por exemplo, situações de temperaturas baixas ou altas, enfrentadas pela cultura precisam ser estudadas para que possam ser compreendidos os efeitos causados nas plantas, e seus mecanismos induzidos para a tolerância a essas condições.

Além disso, mais estudos precisam ser desenvolvidos para alcançarmos um potencial da água da folha, que possa ser usado como indicativo do momento crítico para a aplicação de fungicida, uma vez que sintomas de fitotoxidez podem decorrer dessa aplicação em situações de déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

AGHAIE, P.; TAFRESHI, S. A. H.; EBRAHIMI, M. A.; HAERINASAB, M. Tolerance evaluation and clustering of fourteen tomato cultivars grown under mild and severe drought conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 232, p. 1-12, 2018.

AKTER, S.; HUANG, J.; WASZCZAK, C.; JACQUES, S.; GEVAERT, K.; VAN BREUSEGEM, F.; MESSENS, J. Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2935-2944, 2015.

ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILLA, M. R.; ALBRECHT, A. P. Plant growth regulator in the chemical composition and yield of soybeans. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 774-782, 2012.

ALI, E. F.; HASSAN, F. A. S. Impact of foliar application of commercial amino acids nutrition on the growth and flowering of *Tagetes erecta* L. plant, **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 1, p. 652-657, 2013.

ANDERSON, D.; PRASAD, K.; STEWART, R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.

ANJUM, S. A.; WANG, L.; FAROOQ, M.; XUE, L.; ALI, S. Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 409-417, 2011.

AOU-OUAD, H. E.; BOTA, J.; OBATA, T.; MONTERO, R.; FERNIE, A. R.; MEDRANO, H.; POU, A.; FLOREZ-SARASA, I. Combined drought and virus infection trigger aspects of respiratory metabolism related to grapevine physiological responses. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, p. 19-30, 2018.

ASHRAF, M. A.; ASHRAF, M.; SHAHBAZ, M. Growth stage-based modulation in antioxidant defense system and proline accumulation in two hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Flora**, v. 207, p. 388-397, 2012.

ASHRAF, M. A.; RASHEED, R.; HUSSAIN, I.; IQBAL, M.; HAIDER, M. Z.; PARVEEN, S.; SAJID, M. A. Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 4, p. 507-523, 2015.

AWASTHI, J. P.; SAHA, B.; REGON, P.; SAHOO, S.; CHOWRA, U.; PRADHAN, A.; ROY, A.; PANDA, S. K. Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. **Plos One**, v. 12, n. 4, article e0176357, 2017.

AYUB, G.; SMITH, R. A.; TISSUE, D. T.; ATKIN, O. K. Impacts of drought on leaf respiration in darkness and light in *Eucalyptus saligna* exposed to industrial-age atmospheric CO₂ and growth temperature. **New Phytologist**, v. 190, n. 4, p. 1003-1018, 2011.

BAKER, N.; ROSENQVIST, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BARTOLI, C. G.; GOMEZ, F.; GERGOFF, G.; GUIAMÉT, J. J.; PUNTARULO, S. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 415, p. 1269-1276, 2005.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, 2000.

BIAN, S.; JIANG, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 264-270, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1222-1227, 1992.

CARDUCCI, C. E.; OLIVEIRA, G. C.; SEVERIANO, C. E.; ZEVIANI, W. M. Modelagem da curva de retenção de água de latossolos utilizando a equação duplo Van Genuchten. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 77-86, 2011.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 563-571, 2004.

CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. **Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress**. In: Shanker A, editor. Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives. London: InTechOpen; 2016, 463 p.

CHAITANYA, K. K.; NAITHANI, S. C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. **New Phytologist**, v. 126, p. 623-627, 1994.

CHAVARRIA, G.; DURIGON, M. R.; KLEIN, V. A.; KLEBER, H. Restrição fotossintética de plantas de soja sob variação de disponibilidade hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n. 8, p. 1387-1393, 2015.

CHEN, Y. E.; LIU, W. J.; SU, Y. Q.; CUI, J. M.; ZHANG, Z. W.; YUAN, M.; ZHANG, H. Y.; YUAN, S. Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 225-235, 2016.

CHENG, Z. W.; CHEN, Z. Y.; YAN, X.; BIAN, Y. W.; DENG, X.; YAN, Y. M. Integrated physiological and proteomic analysis reveals underlying response and defense mechanisms of *Brachypodium distachyon* seedling leaves under osmotic stress, cadmium and their combined stresses. **Journal of Proteomics**, v. 170, p. 1-13, 2018.

CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, p. 856-867, 2017.

COUTURIER, J.; CHIBANI, K.; JACQUOT, J-P.; ROUHIER, N. Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, article 105, 2013.

CRUZ de CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, p. 156-165, 2008.

DAS, A.; ELDAKAK, M.; PAUDEL, B.; KIM, D. W.; HEMMATI, H.; BASU, C.; ROHILA, J. S. Leaf proteome analysis reveals prospective drought and heat stress response mechanisms in soybean. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-23, 2016.

DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1703, n. 2, p. 93-109, 2005.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DEVI, M. K. A.; GIRIDHAR, P. Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, p. 35-44, 2015.

DIAS, M. C.; FIGUEIREDO, P.; DUARTE, I. F.; GIL, A. M.; SANTOS, C. Different responses of young and expanded lettuce leaves to fungicide Mancozeb: chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, pigments and proline content. **Photosynthetica**, v. 52, p. 148-151, 2014.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

DU, Y. L.; WANG, Z. Y.; FAN, J. W.; TURNER, N. C.; WANG, T.; LI, F. M. β -Aminobutyric acid increases abscisic acid accumulation and desiccation tolerance and decreases water use but fails to improve grain yield in two spring wheat cultivars under soil drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 13, p. 4849-4860, 2012.

DUC, N. H.; CSINTALAN, Z.; POSTA, K. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigate negative effects of combined drought and heat stress on tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 297-307, 2018.

DUNSTONE, R. L.; RICHARDS, R. A.; RAWSON, H. M. Variable responses of stomatal conductance, growth, and yield to fulvic acid applications to wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 4, p. 547-553, 1988.

DURANGO, D.; PULGARIN, N.; ECHEVERRI, F.; ESCOBAR, G.; QUIÑONES, W. Efeito do ácido salicílico e compostos estruturalmente relacionados no acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Moléculas**, v. 18, n. 9, p. 10609-10628, 2013.

ELDAKAK, M.; MILAD, S.; NAWAR, A. I.; ROHILA, J. S. Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, article 35, 2013.

ERTANI, A.; CAVANI, L.; PIZZEGHELLO, D.; BRANDELLERO, E.; ALTISSIMO, A.; CIAVATTA, C.; NARDI, S. Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, n. 2, p. 237-244, 2009.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant Soil**, v. 364, p. 145-158, 2013.

ESCALONA, J. M.; TOMÁS, M.; MARTORELL, S.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M.; FLEXAS, J. Carbon balance in grapevines under different soil water supply: importance of whole plant respiration. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 18, n. 3, p. 308-318, 2012.

FAGAN, E. B.; DOURADO NETO, D.; VIVIAN, R.; FRANCO, R. B.; YEDA, M. P.; MASSIGNAM, L. F.; OLIVEIRA, R. F.; MARTINS, K. V. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 771-777, 2010.

FARNESE, F. S.; MENEZES-SILVA, P. E.; GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J. A. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 471, 2016.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185-212, 2009.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 12 p. (Special Report, 80).

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 835-842, 2010.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

GALMÉS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Response of leaf respiration to water stress in Mediterranean species with different growth forms. **Journal of Arid Environments**, v. 68, n. 2, p. 206-222, 2007.

GHOSH, A. K.; ISHIJIKI, K.; TOYOTA, M.; KUSUTANI, A.; ASANUMA, K. Water potential, stomatal dimension and leaf gas exchange in soybean plants under long-term moisture deficit. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v. 44, n. 1, p. 30-37, 2000.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GIULIANI, M. M.; CARUCCI, F.; NARDELLA, E.; FRANCAVILLA, M.; RICCIARDI, L.; LOTTI, C.; GATTA, G. Combined effects of deficit irrigation and strobilurin application on gas exchange, yield and water use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 149-158, 2018.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207-212, 1980.

GROSSMANN, K.; KWIATKOSWSKI, J.; CASPAR, G. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin Kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 154, p. 805-808, 1999.

GULER, N. S.; PEHLIVAN, N. Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine max* L.) through inducing antioxidant system. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, p. 169-183, 2016.

HABIBI, D. Evaluation of antioxidant enzymes activity in sugar beet genotypes under drought stress. **MAGNT Research Report**, v. 2, p. 225-238, 2014.

HAO, L.; WANG, Y.; ZHANG, J.; XIE, Y.; ZHANG, M.; DUAN, L.; LI, Z. Coronatine enhances drought tolerance via improving antioxidative capacity to maintaining higher photosynthetic performance in soybean. **Plant Science**, v. 210, p. 1-9, 2013.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ANEE, T. I.; KHAN, M. I. R.; FUJITA M. Silicon-mediated regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems confers drought stress tolerance in *Brassica napus* L. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 50-57, 2018.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HUANG, C.; ZHAO, S.; WANG, L.; ANJUM, S. A.; CHEN, M.; ZHOU, H.; ZOU, C. Alteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 594-599, 2013.

HU, W.; XIAO, Y. A.; ZENG, J. J.; HU, X. H. Photosynthesis, respiration and antioxidant enzymes in pepper leaves under drought and heat stresses. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 761-765, 2010.

ISLAM, F.; ALI, B.; WANG, J.; FAROOQ, M. A.; GILL, R. A.; ALI, S.; WANG, D.; ZHOU, W. Combined herbicide and saline stress differentially modulates hormonal regulation and antioxidant defense system in *Oryza sativa* cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 82-95, 2016.

IYER, N. J.; TANG, Y.; MAHALINGAM, R. Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, p. 706-720, 2013.

JAVADI, T.; ROHOLLAHI, D.; GHADERI, N.; NAZARI, F. Mitigating the adverse effects of drought stress on the morphophysiological traits and anti-oxidative enzyme activities of *Prunus avium* through β -amino butyric acid drenching. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 156-163, 2017.

JOVANOVIĆ, Ž. S.; MAKSIMOVIĆ, V. R.; RADOVIĆ, S. R. Biochemical and molecular changes in buckwheat leaves during exposure to salt stress. **Archives of Biological Sciences**, v. 63, n. 1, p. 67-77, 2011.

JUMRANI, K.; BHATIA, V. S. Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 1, p. 37-50, 2018.

KANUNGO, M.; JOSHI, J. Impact of Pyraclostrobin (F-500) on Crop Plants. **Plant Science Today**, v. 1, n. 3, p. 174-178, 2014.

KATERJI, N. Use of simulation methods for determining critical leaf water potential for stomatal closure in field conditions. **Ecological Modelling**, v. 50, p. 133-144, 1990.

KAUFFMAN, G. L.; KNEIVEL, D. P.; WATSCHKE, T. L. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. **Crop Science**, v. 47, p. 261-267, 2007.

KAUSAR, R.; HOSSAIN, Z.; MAKINO, T.; KOMATSU, S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 10573-10579, 2012.

KHAN, M. S. A.; KARIM, M. A.; ABULLAH-AL-MAHMUD; PARVEEN, S.; BAZZAZ, M. M.; HOSSAIN, M. A. Plant water relations and proline accumulations in soybean under salt and water stress environment. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 5, p. 272-278, 2015.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; CRITCHLEY, A. T.; CRAIGIE, J. S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 4, p. 386-399, 2009.

KHOSRAVINEJAD, F.; HEYDARI, R.; FARBOODNIA, T. Effects of salinity on photosynthetic pigments, respiration and water content in two barley varieties. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 11, n. 20, p. 2438-2442, 2008.

KLAHOLD, C. A.; GUIMARÃES, V. F.; ECHER, M. M.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R. L.; BECKER, A. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p. 179-185, 2006.

KÖHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; STIERL, R.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. **Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants**. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds III. Bonn, Germany, 2002.

LI, M.; LI, S.; ZHANG, S.; CHI, B. Physiological effect of new FA antitranspirant on winter wheat at ear filling stage. **Agricultural Sciences in China**, v. 4, n. 11, p. 820-825, 2005.

LI, W.; ZHANG, C.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 15, p. 1743-1752, 2011.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MA, X.; WANG, G.; ZHAO, W.; YANG, M.; MA, N.; KONG, F.; DONG, X.; MENG, Q. SICOR413IM1: A novel cold-regulation gene from tomato, enhances drought stress tolerance in tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v. 216, p. 88-99, 2017.

MAKBUL, S.; GÜLER, N. S.; DURMUŞ, N.; GÜVEN, S. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 35, p. 369-377, 2011.

MANUCHEHRI, R.; SALEHI, H. Physiological and biochemical changes of common bermudagrass (*Cynodon dactylon* [L.] Pers.) under combined salinity and deficit irrigation stresses. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 83-88, 2014.

MARQUES, L. N. **Fertilizante foliar em associação com fungicida em trigo**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MASOUMI, H.; MASOUMI, M.; DARVISH, F.; DANESHIAN, J.; NOURMOHAMMADI, G.; HABIBI, D. Change in several antioxidant enzymes activity and seed yield by water deficit stress in soybean (*Glycine max* L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 86-94, 2010.

MELLIDOU, I.; MOSCHOU, P. N.; IOANNIDIS, N. E.; PANKOU, C.; GÈMES, K.; VALASSAKIS, C.; ANDRONIS, E. A.; BERIS, D.; HARALAMPIDIS, K.; ROUSSIS, A.; KARAMANOLI, A.; MATSI, T.; KOTZABASIS, K.; CONSTANTINIDOU, H-I.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Silencing S-Adenosyl-L-Methionine Decarboxylase (SAMDC) in *Nicotiana tabacum* points at a polyamine-dependent trade-off between growth and tolerance responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 379, 2016.

MHAMDI, A; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, v. 145, dev164376, 2018.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, n.1, p. 15-19, 2006.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 443-462, 2010.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 11-19, 2017.

MOHAMMADKHANI, N; HEIDARI, R. Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 22, p. 4022-4028, 2007.

MOLOI, M. J.; MWENYE, O. J.; VAN DER MERWE, R. Differential involvement of ascorbate and guaiacol peroxidases in soybean drought resistance. **South African Journal of Science**, v. 112, p. 1-4, 2016.

MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; BRACCINI, A. L.; BARBOSA, M. C. Efeito da aplicação de biorregulador no desempenho agrônômico e produtividade da soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, p. 701-709, 2008.

NAHAR, S.; VEMIREDDY, L. R.; SAHOO, L.; TANTI, B. Antioxidant protection mechanisms reveal significant response indrought-induced oxidative stress in some traditional rice of Assam, India. **Rice Science**, v. 25, p. 185-196, 2018.

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

NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 106-113, 2006.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, p. 1636-1648, 2014.

NOSTAR, O.; OZDEMIR, F.; BOR, M.; TURKAN, I.; TOSUN, N. Combined effects of salt stress and cucurbit downy mildew (*Pseudoperospora cubensis* Berk. and Curt. Rostov.) infection on growth, physiological traits and antioxidant activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 84-92, 2013.

ORTIZ-LOPEZ, A.; ORT, D. R.; BOYER, J. S. Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1018-1025, 1991.

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

PARADIKOVIĆ, N.; VINKOVIĆ, T.; VINKOVIĆ VRČEK, I.; ŽUNTAR, I.; BOJIĆ, M.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2146-2152, 2011.

PÉREZ-LÓPEZ, U.; MIRANDA-APODACA, J.; MUÑOZ-RUEDA, A.; MENA-PETITE, A. Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1517-1525, 2013.

PETIT, N. A.; FONTAINE, F.; VATSA, P.; CLÉMENT, C.; VAILLANT-GAVEAU, N. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. **Photosynthesis Research**, v. 111, p. 315-326, 2012.

RIBAS-CARBO, M.; TAYLOR, N. L.; GILES, L.; BUSQUETS, S.; FINNEGAN, P. M.; DAY, D. A.; LAMBERS, H.; MEDRANO, H.; BERRY, J. A.; FLEXAS, J. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. **Plant Physiology**, v. 139, p. 466-473, 2005.

RIVERO, R. M.; MESTRE, T. C.; MITTLER, R.; RUBIO, F.; GARCIA-SANCHEZ, F.; MARTINEZ, V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, p. 1059-1073, 2013.

RUPPENTHAL, V.; ZOZ, T.; STEINER, F.; LANA, M. C.; CASTAGNARA, D. D. Silicon does not alleviate the adverse effects of drought stress in soybean plants. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 3941-3954, 2016.

SAHIN, U.; EKINCI, M.; ORS, S.; TURAN, M.; YILDIZ, S.; YILDIRIM, E. Effects of individual and combined effects of salinity and drought on physiological, nutritional and biochemical properties of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 196-204, 2018.

SALADIN, G.; MAGNÉ, C.; CLÉMENT, C. Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. **Pest Management Science**, v. 59, p. 1083-1092, 2003.

SCHNEIDER, J. R.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Water deficit stress, ROS involvement, and plant performance. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, p. 1160-1181, 2019.

SEKMEN, A. H.; OZGUR, R.; UZILDAY, B.; TURKAN, I. Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 141-149, 2014.

SENTELHAS, P. C.; BATTISTI, R.; CÂMARA, G. M. S.; FARIAS, J. R. B.; HAMPF, A. C.; NENDEL, C. The soybean yield gap in Brazil – magnitude, causes and possible solutions for sustainable production. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 8, p. 1394-1411, 2015.

SHAHENSHAH; ISODA, A. Effects of water stress on leaf temperature and chlorophyll fluorescence parameters in cotton and peanut. **Plant Production Science**, v. 13, n. 3, 269-278, 2010.

SHAHID, M.; AHMED, B.; ZAIDI, A.; KHAN, M. S. Toxicity of fungicides to *Pisum sativum*: a study of oxidative damage, growth suppression, cellular death and morpho-anatomical changes. **RSC Advances**, v. 8, p. 38483-38498, 2018.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 209-22, 2005.

SHEN, X.; ZHOU, Y.; DUAN, L.; LI, Z.; ENEJI, E.; LI, J. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1248-1252, 2010.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 14, p. 1157-1164, 2010.

SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, p. 69-76, 2015.

SMIRNOFF, N.; ARNAUD, D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. **New Phytologist**, v. 221, n. 3, p. 1197-1214, 2019.

STIBOROVÁ, M.; DOUBRAVOVÁ, M.; BREZINOVÁ, A.; FRIEDRICH, A. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordeum vulgare* L. **Photosynthetica**, v. 20, p. 418-425, 1986.

SUASSUNA, J. F.; MELO, A. S.; COSTA, F. S.; FERNANDES, P. D.; FERREIRA, R. S.; SOUSA, M. S. S. Eficiência fotoquímica e produtividade de frutos de meloeiro cultivado sob diferentes lâminas de irrigação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1251-1262, 2011.

SUN, Y.; WANG, H. LIU, S. PENG, X. Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. **South African Journal of Botany**, v. 106, p. 23-28, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 858 p.

TANG, Y.; SUN, X.; WEN, T.; LIU, M.; YANG, M.; CHEN, X. Implications of terminal oxidase function in regulation of salicylic acid on soybean seedling photosynthetic performance under water stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 19-28, 2017.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

TOMMASINO, E.; COLOMBA, E. L.; CARRIZO, M.; GRUNBERG, K.; QUIROGA, M.; CARLONI, E.; GRIFFA, S.; RIBOTTA, A.; LUNA, C. Individual and combined effects of drought and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 104-111, 2018.

UGENA, L.; HÝLOVÁ, A.; PODLEŠÁKOVÁ, K.; HUMPLÍK, J. F.; DOLEŽAL, K.; DE DIEGO, N.; SPÍCHAL, L. Characterization of biostimulant mode of action using novel multi-trait high-throughput screening of *Arabidopsis* germination and rosette growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, article 1327, 2018.

URBAN, O.; HLAVÁČOVÁ, M.; KLEM, K.; NOVOTNÁ, K.; RAPANTOVÁ, B.; SMUTNÁ, P.; HLAVINKA, P.; ŠKARPA, P.; TRNKA, M. Combined effects of drought and high temperature on photosynthetic characteristics in four winter wheat genotypes. **Field Crops Research**, v. 223, p. 137-149, 2018.

VASCONCELOS, A. C. F.; ZHANG, X.; ERVIN, E. H.; KIEHL, J. C. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 395-402, 2009.

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 3, n. 3, p. 59-68, 2003.

VILE, D.; PERVENT, M.; BELLUAU, M.; VASSEUR, F.; BRESSON, J.; MULLER, B.; GRANIER, C.; SIMONNEAU, T. *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 4, p. 702-718, 2012.

WANG, H.; YANG, L.; LI, Y.; HOU, J.; HUANG, J.; LIANG, W. Involvement of ABA- and H₂O₂-dependent cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase in maintaining redox

homeostasis in soybean roots under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 126-136, 2016.

WANG, Y.; BRANICKY, R.; NOË, A.; HEKIMI, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v.217, n. 6, p. 1915-1928, 2018.

WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164-170, 2015.

WU, Y. X.; VON TIEDEMANN, A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. **Environmental Pollution**, v. 116, n. 1, 37-47, 2002.

XING, X. H.; FANG, C. W.; LI, L.; JIANG, H. Q.; ZHOU, Q.; JIANG, H. D.; WANG, S. H. Improved drought tolerance by α -naphthaleneacetic acid-induced ROS accumulation in two soybean cultivars. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, p. 1770-1784, 2016.

XU, L.; WANG, A.; WANG, J.; WEI, Q.; ZHANG, W. *Piriformospora indica* confers drought tolerance on *Zea mays* L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes. **The Crop Journal**, v. 5, p. 251-258, 2017.

XUDAN, X. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and yield in wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 37, p. 343-350, 1986.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 2049, 2017.

YANG, P. M.; HUANG, Q. C.; QIN, G. Y.; ZHAO, S. P.; ZHOU, J. G. Different drought-stress responses in photosynthesis and reactive oxygen metabolism between autotetraploid and diploid rice. **Photosynthetica**, v. 52, p. 193-202, 2014.

ZAMBIAZZI, E. V.; BRUZI, A. T.; CARVALHO, M. L. M.; GUILHERME, S. R.; ZUFFO, A. M.; CARVALHO, A. H. F.; MENDES, A. E. S.; SOARES, I. O.; BORGES, I. M.; BIANCHI, M. C.; VILLELA, N. J. D. Effects and management of foliar fungicide application on physiological and agronomical traits of soybean. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2018.

ZANDALINAS, S. I.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A.; INUPAKUTIKA, M. A.; MITTLER, R. ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 18, p. 5381-5390, 2016.

ZANDALINAS, S. I.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 953, 2017.

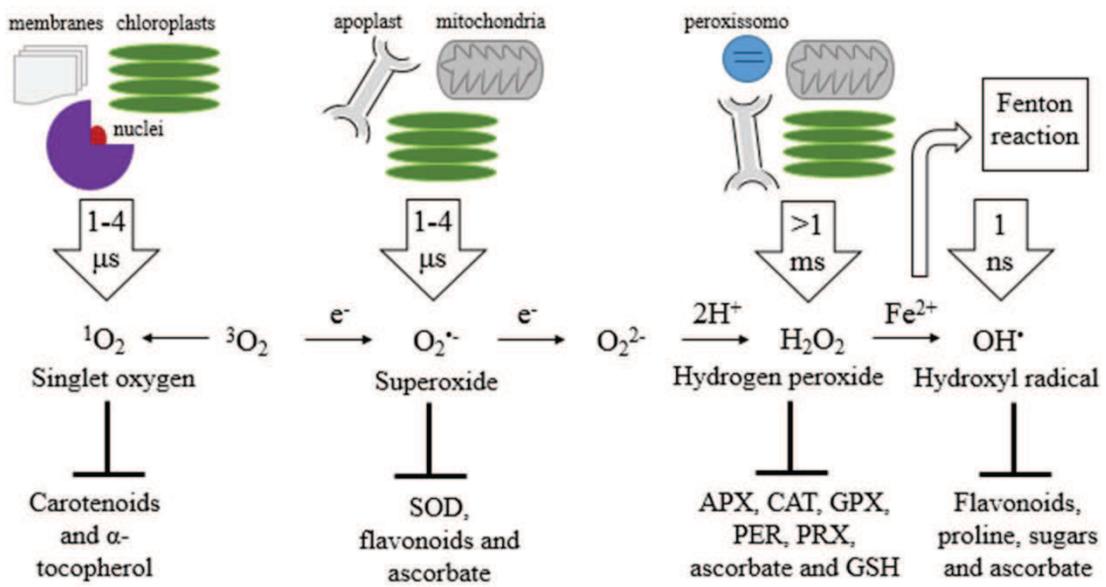
ZANDALINAS, S. I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, p. 2-12, 2018.

ZHANG, J.; LIU, J.; YANG, C.; DU, S.; YANG, W. Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 279-287, 2016.

ZHANG, Y. J.; ZHANG, X.; CHEN, C. J.; ZHOU, M. G.; WANG, H. C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield in winter wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 151-157, 2010.

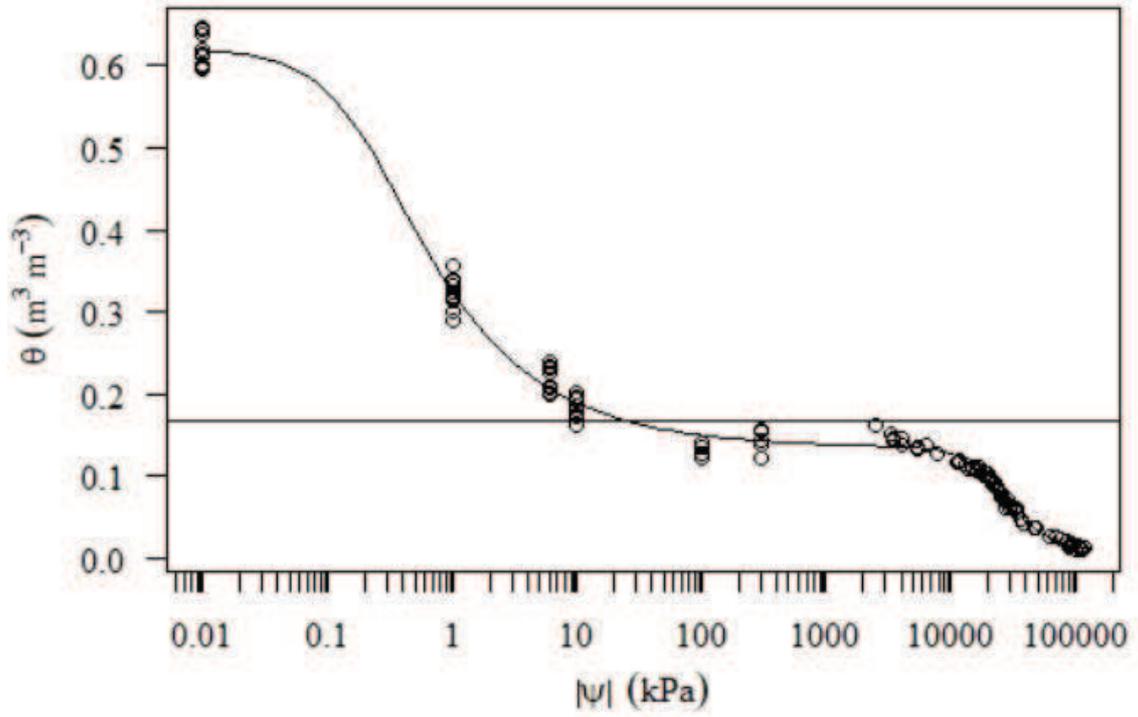
ANEXOS

Anexo I Locais de produção de espécies reativas de oxigênio e sistemas de defesa.



APÊNDICE

Apêndice I Curva de retenção da água da mistura solo + substrato.





PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV