

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, INOVAÇÃO E NEGÓCIOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Interações entre xenobióticos e bioestimulante na fisiologia da soja sob
déficit hídrico**

Julia Renata Schneider

Passo Fundo

2023

Julia Renata Schneider

Interações entre xenobióticos e bioestimulante na fisiologia da soja sob déficit hídrico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Escola de Ciências Agrárias, Inovação e Negócios da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Agronomia.

Orientador:

Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior

Passo Fundo

2023

CIP – Catalogação na Publicação

S358i Schneider, Julia Renata

Interações entre xenobióticos e bioestimulante na fisiologia da soja sob déficit hídrico / Julia Renata Schneider. – 2022.

145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2022.

1. Soja. 2. Estresse oxidativo. 3. Plantas - Efeito da seca.
4. Fisiologia vegetal. I. Lamas Junior, Geraldo Luiz Chavarria, orientador. II. Título.

CDU: 633.34

Catálogo: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

ATA DE DEFESA DA TESE



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“INTERAÇÕES ENTRE XENOBIÓTICOS E BIOESTIMULANTE NA FISIOLOGIA DA SOJA SOB DÉFICIT HÍDRICO”

Elaborada por

Julia Renata Schneider

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 12/07/2022
Pela Comissão Examinadora

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

Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira
Membro externo - UFC

Dr. José Luís Trevizan Chiomento
Membro interno - UPF

Dra. Nadia Canali Lângaro
Coordenadora do PPGAgro

Dr. Marcelo Griça Madalosso
Membro externo - URI

Dra. Cleide Fátima Moretto
Diretora da Escola de Ciências Agrárias, Inovação e
Negócios - ESAN/UPF

Dra. Mariele Müller
Examinador externo
Mais Crop

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo aos meus pais, que são o maior exemplo de dedicação. Admiro vocês demais. Todas minhas conquistas carregam um pedaço de vocês. Vocês são incríveis e minhas inspirações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, e por todas as coisas.

À minha família, meus pais M^a Jurema e Ronaldo, pelo amor e apoio incondicionais. Ao meu irmão e minha cunhada, Renan e Fernanda, pelo incentivo e estímulo. Às minhas sobrinhas, Catharina e Theodora, por iluminar e trazer alegria à essa jornada. Aos demais familiares que apoiam e incentivam.

Ao meu orientador, Dr. Geraldo, por ser inspiração. Muito mais que um orientador, foi um amigo, sempre disposto a colaborar. Agradeço pela paciência e confiança comigo.

À professora Dra. Tanise Sausen pela ajuda nas avaliações fisiológicas do capítulo III. Agradeço pela amizade, pelo incentivo e pelas correções e sugestões na qualificação. Aos demais professores da banca de qualificação, Dra. Jaqueline Huzar-Novakowski e Dr. Mateus Possebon Bortoluzzi pelas ricas discussões e contribuições de melhoria do trabalho.

Aos professores da banca de avaliação dessa tese, Dr. Marcelo Gripa Madalosso, Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, Dr. José Luís Trevizan Chiomento e Dra. Mariele Müller pelas valiosas considerações a respeito do trabalho desenvolvido.

Às colegas de laboratório, Andressa Carlot de Bona, Brenda Gallina Viegas e Mariele Müller pela amizade, pela ajuda e pela parceria. Agradeço em especial a Andressa por acreditar sempre no trabalho, pela intensa ajuda no trabalho compartilhado para conclusão de curso, e por me motivar a cada novo dia.

Aos professores da Universidade de Passo Fundo pelo conhecimento compartilhado, pela amizade, pela orientação. A todos que emprestaram laboratório e equipamentos, muito obrigada. Agradeço por terem confiado em mim, e no trabalho, isso foi essencial. Aos funcionários por auxiliar sempre que necessário, em especial à Manuelli Zulpo que nunca mediu esforços em ajudar e a Patrícia, secretária da pós, pela agilidade e prestatividade.

Aos colegas da pós graduação, em especial à Carolina Trentin, colega de longa data, e que tive a oportunidade de reencontrar nesse período, e a Joseane Rizzardo pela amizade e pela energia maravilhosa que compartilha. Agradeço ao Maicon Balbinotti pela amizade incrível e por ser um grande incentivador do trabalho. Obrigada pelos conselhos e pelas dicas na condução dos trabalhos.

À Natália Freddo pelas incontáveis explicações. Uma profissional maravilhosa que foi essencial ao me ajudar com os protocolos de bioquímica.

À minha amiga Pâmela Sandri pelo incentivo, por admirar o trabalho, e pela linda amizade compartilhada nesse período. Obrigada por me escutar e me acalmar tantas vezes.

Aos meus colegas da SulGesso pelo apoio e pela compreensão na reta final, durante a análise de dados e redação da tese.

“A essência do conhecimento científico é a sua aplicação prática”.

Confúcio (551-479 a.C).

RESUMO

SCHNEIDER, Julia Renata. Interações entre xenobióticos e bioestimulante na fisiologia da soja sob déficit hídrico. 2022. 145 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2022.

As plantas se desenvolvem no campo expostas às condições ambientais, podendo essas serem fatores estressantes, de origem biótica ou abiótica. Nesse estudo avaliamos a influência do déficit hídrico combinado com a aplicação de produtos xenobióticos nas relações fisiológicas e metabolismo antioxidante da soja. Ainda, testamos a eficiência de um produto bioestimulante, mitigador de estresse na aliviação dos sintomas desencadeados pelo estresse. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e em blocos, em ambiente controlado, para eliminar interações de outros fatores estressantes, sendo em câmara de crescimento, com temperatura, umidade e luminosidade controladas. O déficit hídrico e a exposição aos xenobióticos são fatores estressantes que ocorrem simultaneamente durante o desenvolvimento da cultura e podem ser responsáveis por gerar estresse oxidativo, quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os compostos antioxidantes de defesa das plantas. Essa situação, dependendo de qual intensidade ocorre, gera diversas alterações no metabolismo, incluindo danos a nível celular e molecular. Nesse estudo observamos que a combinação de déficit hídrico com o xenobióticos macozebe não causou efeitos deletérios. Os xenobióticos utilizados aumentaram o metabolismo das plantas, quando em condições irrigadas, indicando que, além de sua função fungicida, podem trazer outros benefícios indiretos. Déficit hídrico desencadeou acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células, as quais causaram danos em membranas, e peroxidação lipídica, aumento na atividade de enzimas e compostos antioxidantes e incremento na concentração de prolina e óxido nítrico. A prolina também se acumulou nas células de plantas tratadas com o bioestimulante, o que indicou o seu papel como indutor de defesas em plantas estressadas. O composto bioestimulante também foi responsável pela ativação do metabolismo antioxidante da planta, sugerindo que a planta recupera seu metabolismo muito antes de ser afetado. Isso evita danos e gasto energético nessa recuperação, energia essa que será demandada para produção de grãos, evitando a perda de produtividade. A combinação dos xenobióticos com o bioestimulante pode ser indicada.

Palavras-chave: 1. Estresse oxidativo. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Antioxidantes. 4. *Glycine max*. 5. Fotossíntese.

ABSTRACT

SCHNEIDER, Julia Renata. Interactions between xenobiotics and biostimulant in physiology of soybean under water deficit. 2022. 145 f. Thesis (Doctoral degree in Agronomy) - University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2022.

Plants develop in field conditions exposed to environmental conditions, biotic or abiotic stressors. In this study we evaluated the influence of water deficit combined with the application of xenobiotic products on the physiological relationships and antioxidant metabolism of soybean. Furthermore, we tested the efficiency of a biostimulant, as a stress reliever mitigating symptoms triggered by stress. The experiments were conducted in a controlled environment, to eliminate interactions of other stressors, in a growth chamber, with controlled temperature, humidity and luminosity. Water deficit and exposure to xenobiotics are stressors that occur simultaneously during the development of the crop, and may be responsible for generating oxidative stress, when there is an imbalance between the production of reactive oxygen species, and the antioxidant compounds of plant defense. This situation, depending on which intensity occurs, generates several changes in metabolism, including damage at the cellular and molecular levels. In this study we observed that the combination of water deficit with the xenobiotic mancozeb did not cause deleterious effects. The xenobiotics applied in this study increased plant metabolism under irrigated conditions, indicating that in addition to their fungicidal function, they can bring other indirect benefits. Water deficit triggered the accumulation of reactive oxygen species in cells, which caused damage to membranes, and lipid peroxidation, increased activity of enzymes and antioxidant compounds, and increased concentration of proline and nitric oxide. Proline also accumulated in the cells of plants treated with the biostimulant, which indicates its role as a defense inducer in these stressed plants. The biostimulant compound was also responsible for activating the plant's antioxidant metabolism, which is extremely important, since the plant recovers its metabolism long before it is affected, preventing damage, and avoiding the spent in this recovery, energy that will be demanded for grain production, avoiding loss of productivity. Combination of xenobiotic and biostimulant could be used.

Key words: 1. Oxidative stress. 2. Reactive oxygen species. 3. Antioxidants. 4. *Glycine max* 5. Photosynthesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	<i>Estresse</i>	17
2.2	<i>Déficit hídrico</i>	19
2.3	<i>Estresse oxidativo</i>	21
2.4	<i>Xenobióticos</i>	23
2.5	<i>Bioestimulantes</i>	28
3	CAPÍTULO I	30
3.1	<i>Resumo</i>	30
3.2	<i>Introdução</i>	30
3.3	<i>Material e Métodos</i>	32
3.3.1	Material vegetal e local do experimento	32
3.3.2	Delineamento experimental e tratamentos	33
3.3.3	Procedimentos experimentais	33
3.3.4	Avaliações fisiológicas	36
3.3.5	Avaliações bioquímicas	37
3.3.6	Análises estatísticas	42
3.4	<i>Resultados e Discussão</i>	43
3.4.1	Pigmentos fotossintéticos	44
3.4.2	Fluorescência total da clorofila e rendimento quântico do fotossistema II	45
3.4.3	Espécies reativas de oxigênio	47
3.4.4	Danos oxidativos	49
3.4.5	Enzimas antioxidantes	50
3.4.6	Compostos antioxidantes não-enzimáticos	52
3.4.7	Correlação	55
3.4.8	Análise multivariada de componentes principais	57
3.5	<i>Conclusões</i>	58
4	CAPÍTULO II	59
4.1	<i>Resumo</i>	59
4.2	<i>Introdução</i>	59
4.3	<i>Material e Métodos</i>	61

4.3.1	Sujeito da pesquisa e local do experimento	61
4.3.2	Delineamento experimental e tratamentos	62
4.3.3	Procedimentos experimentais	63
4.3.4	Coletas e avaliações	64
4.3.5	Óxido nítrico	65
4.3.6	Prolina	65
4.3.7	Análise estatística	65
4.4	<i>Resultados e Discussão</i>	66
4.4.1	Óxido nítrico	66
4.4.2	Prolina	68
4.5	<i>Conclusões</i>	71
5	CAPÍTULO III	72
5.1	<i>Resumo</i>	72
5.2	<i>Introdução</i>	72
5.3	<i>Material e Métodos</i>	73
5.3.1	Sujeito da pesquisa e local do experimento	73
5.3.2	Delineamento experimental e tratamentos	74
5.3.3	Procedimentos experimentais	77
5.3.4	Avaliações fisiológicas	79
5.3.5	Avaliações bioquímicas	80
5.3.6	Análise estatística	81
5.4	<i>Resultados e Discussão</i>	82
5.4.1	Temperatura foliar, trocas gasosas e fotossíntese	82
5.4.2	Pigmentos fotossintéticos	85
5.4.3	Conteúdo relativo de água e danos em membranas	87
5.4.4	Espécies reativas de oxigênio	89
5.4.5	Antioxidantes	94
5.4.6	Nitrito e prolina	96
5.4.7	Correlações	98
5.4.8	Análise multivariada de componentes principais	100
5.5	<i>Conclusões</i>	104
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7	CONCLUSÃO GERAL	107
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXOS	129

Anexo I “Matriz de estresse” mostrando interação entre diferentes estresses, sendo positiva, negativa, sem interação ou desconhecida. Adaptada de Mittler (2006), modificada por Mittler e Blumwald (2010) e Suzuki et al. (2014). 130

<i>Anexo II</i>	<i>Produção de espécies reativas de oxigênio por transferência de energia, incluindo os locais de produção e os principais sistemas de eliminação.</i>	<i>131</i>
APÊNDICES		132
<i>Apêndice I</i>	<i>Tabelas da análise de variância do experimento do capítulo I.</i>	<i>133</i>
<i>Apêndice II</i>	<i>Tabelas da análise de variância dos experimentos do capítulo II.</i>	<i>136</i>
<i>Apêndice III</i>	<i>Tabelas da análise de variância do experimento do capítulo III.</i>	<i>138</i>
<i>Apêndice IV</i>	<i>Biplot das contribuições das variáveis na variância total explicada pela ACP do capítulo I.</i>	<i>141</i>
<i>Apêndice V</i>	<i>Biplot contribuições das variáveis na variância total explicada pela ACP do capítulo III.</i>	<i>143</i>

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] tem elevada relevância econômica no Brasil. Muito utilizada na alimentação humana, animal, e em biocombustíveis, a oleaginosa representa grande parte da área plantada e uma boa fonte de renda para os produtores. Com pouca possibilidade de expansão da área plantada, o melhoramento busca cultivares mais produtivas, que muitas vezes não conseguem expressar seu potencial devido a fatores estressantes, bióticos e abióticos, decorrentes de condições adversas enfrentadas durante seu cultivo.

Um dos principais fatores limitantes à produção de soja é a disponibilidade de água, ou seja, o excesso ou a falta de água às plantas. A quantidade requerida pela cultura durante o seu ciclo de cultivo dificilmente é controlada, pois depende das condições ambientais, exceto casos que se tenha estrutura e disponibilidade para irrigação. Portanto, muitas vezes, no decorrer do ciclo, as plantas podem ficar expostas a uma condição de baixa umidade no solo, a qual pode impactar seus processos fisiológicos e bioquímicos e refletir em diminuição da produtividade, principalmente se coincidir com períodos críticos da cultura, em que há uma maior demanda (da semeadura à emergência e durante o enchimento dos grãos).

Os produtores de soja devem estar atentos ao manejo fitossanitário nos períodos de déficit hídrico, tomando cuidado com o momento de aplicação de fungicidas, pois esses defensivos configuram-se como xenobióticos e podem causar efeitos negativos. Alguns fungicidas, quando aplicados em condições adversas, podem causar fitotoxicidade. Essa toxicidade causada às plantas vai se caracterizar pela redução da área fotossinteticamente ativa das plantas, acarretando redução na fotossíntese, a qual vai impactar a produção de energia pelas plantas, além de desencadear danos oxidativos, originados do estresse oxidativo pelo excesso de energia de excitação nessas células. Esses danos podem ser potencializados por outros xenobióticos, provenientes das

misturas em tanque com outros produtos (fungicidas, herbicidas, inseticidas, fertilizantes), assim como pelas condições ambientais, como a alta temperatura do ar.

Algumas estratégias de manejo estão sendo recomendadas para minimizar os danos causados por essas condições desfavoráveis. Realizar as aplicações com condições ambientais adequadas, em horários menos quentes do dia, podem ser consideradas. Além disso, tem-se recomendado a utilização de produtos bioestimulantes, os quais podem auxiliar a planta a tolerar períodos de estresse, geralmente devido ao incremento no seu metabolismo de defesa.

Pesquisas com bioestimulantes demonstram que esses produtos podem atuar de forma complexa nas plantas, interferindo no metabolismo antioxidante. Os bioestimulantes têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo causado por fatores estressantes bióticos ou abióticos, por meio do aumento da defesa das plantas, como a síntese de enzimas e compostos antioxidantes, além da redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, diminuição dos danos celulares, moleculares e oxidativos por elas desencadeados.

Além dos produtos bioestimulantes, a literatura mostra efeitos fisiológicos positivos decorrentes de aplicação de fungicidas. Um exemplo é o mancozebe, que possui ação multissítio, e por isso, reduz o risco de resistência de fitopatógenos a fungicidas sítio-específicos. Assim, representa uma alternativa de associação com outros fungicidas. Observa-se um aumento na eficiência de controle, relatos de redução da fitotoxicidade causada por outros fungicidas e ainda efeitos nutricionais adicionais, devido à presença de zinco e manganês.

A hipótese geral da pesquisa é que a adição do mancozebe e do bioestimulante na aplicação de fungicidas, numa condição de déficit hídrico, auxilia na redução do estresse oxidativo desencadeado por esses fatores. O mancozebe traz um efeito fisiológico e, assim como o bioestimulante, induz a produção de defesas antioxidantes.

Portanto, o objetivo geral desse estudo foi investigar o efeito fisiológico e bioquímico do estresse oxidativo, desencadeado pela combinação de déficit hídrico com a exposição da planta aos xenobióticos e a mitigação dos efeitos estressantes com mancozebe e bioestimulante à base de folcisteína.

Os objetivos específicos do trabalho foram: 1) avaliar se o estresse combinado de déficit hídrico e aplicação de xenobióticos influencia a fisiologia das plantas; 2) verificar se a produção de espécies reativas de oxigênio, a ocorrência de danos oxidativos e a atividade de antioxidantes é aumentada em condição de estresse combinado causado por déficit hídrico e aplicação de xenobióticos; 3) testar se o fungicida mancozebe e o bioestimulante reduzem os danos causados pelos estresses por déficit hídrico e aplicação de xenobióticos, isolados ou em combinação.

A estrutura desta tese contempla uma parte geral composta pela introdução, que insere a problemática, a justificativa de realização do estudo, os objetivos e a hipótese, assim como uma revisão de literatura. Na sequência, são apresentados três capítulos: I. Mancozebe associado ao déficit hídrico: respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de soja; II. Produção de prolina e óxido nítrico em plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água, aplicação de fungicida e bioestimulante; III. Relações fisiológicas e metabolismo antioxidante de plantas de soja sob estresses combinados de déficit hídrico e xenobiótico, e mitigação com bioestimulante. Todos eles possuem introdução e objetivos próprios, metodologia e resultados dos experimentos conduzidos, discussão e conclusões. O trabalho é finalizado com considerações finais e conclusão geral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse

Algumas variações no conceito de estresse são encontradas na literatura. Pela definição de Levitt (1980), estresse é considerado como “qualquer fator ambiental potencialmente desfavorável aos organismos vivos”. O conceito foi ampliado por Lichtenthaler (1998), quando esclarece que “um estresse leve pode ativar o metabolismo celular e aumentar a atividade fisiológica de uma planta, sem causar efeito prejudicial, mesmo se tiver ocorrência de longa duração e, nesse caso, considerado favorável para a planta”. Já um estresse mais severo “causador de danos, que afeta negativamente a planta, podendo se dizer que seria uma condição dependente da dose”.

Conceitos mais recentes de estresse são de Larcher (2000), que define a palavra como “desvio significativo das condições ótimas para a vida, e que induz respostas e mudanças no organismo”, e de Taiz et al. (2017), que referenciam estresse como “uma influência desvantajosa para a planta exercida por fatores externos bióticos ou abióticos”.

Os principais fatores estressantes responsáveis por influenciar o desenvolvimento das plantas são: a alta ou baixa temperatura, o aumento ou redução na intensidade de luz, a falta ou o excesso de água, a alta ou baixa umidade relativa do ar, as deficiências nutricionais, a salinidade, os metais pesados (abióticos) e pragas e doenças (bióticos).

Devido à complexidade de estudos com muitos fatores, a maioria dos trabalhos avalia os efeitos causados por um fator de estresse isolado. Isso, no entanto, não reflete às condições existentes no cultivo das plantas, onde há a ocorrência simultânea de fatores desfavoráveis ao desenvolvimento. A campo, poucas condições ambientais podem ser controladas e isso implica a necessidade de utilização de estratégias

alternativas, como a aplicação de produtos de bioestímulo para reduzir o efeito negativo dos fatores estressantes.

Portanto o desenvolvimento de trabalhos considerando estresses multifatoriais é justificado, pois assim a resposta das plantas frente a dois ou mais fatores estressantes combinados será avaliada (ISLAM et al., 2016; ZANDALINAS et al., 2017) e a partir dessa compreensão o manejo dessas plantas poderá ser recomendado mais acertadamente. Ainda, estudos têm mostrado que a resposta das plantas é única e específica em cada condição diferente de estresse em que é exposta (MITTLER, 2006; PANDEY et al., 2017). Assim, cada nova combinação de fatores estressantes poderá resultar em respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas distintas.

A exposição simultânea da planta a estresses multifatoriais leva a um novo estado de estresse e, portanto, desencadeia outro tipo de resposta, que é diferente da adição das respostas isoladas desses estresses em questão (ISLAM et al., 2016; PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015). A dimensão da complexidade é tamanha que resulta em respostas positivas, negativas ou neutras das plantas em relação às diferentes interações (PANDEY et al., 2017), como demonstrada pela “matriz de estresse” (Anexo I) (MITTLER, 2006; MITTLER; BLUMWALD, 2010; SUSUKI et al., 2014; ZANDALINAS et al., 2018).

Condições estressantes podem desencadear efeitos negativos no metabolismo das plantas, refletindo em redução da produtividade, resposta que pode ser potencializada no caso de dois ou mais estresses (CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016a). Por outro lado, a exposição das plantas a estresses multifatoriais pode também amenizar os efeitos causados por um dos fatores estressantes, quando se compara com a ocorrência desse estresse isolado (MITTLER; BLUMWALD, 2010). Há uma indicação ainda de que a planta será influenciada em maior parte pelo estresse de maior intensidade (VILE et al., 2012).

As respostas das plantas às diferentes intensidades do estresse foram divididas por Petrov et al. (2015) em quatro fases. Numa primeira situação, de estresses mais

moderados, esses levam a um aumento na produção de EROs, as quais atuam na sinalização, e portanto conferem às plantas uma adaptação ao estresse (PETROV et al., 2015). Já, quando aumenta a intensidade, ou mesmo a duração desse estresse, o crescimento e desenvolvimento da planta começa a ser prejudicado. Para estresses mais severos o acúmulo de EROs leva à ocorrência de morte celular programada, e em casos mais extremos, a necrose dos tecidos (PETROV et al., 2015). Esses autores definem a morte celular programada como um processo ativo, controlado geneticamente e que elimina de forma coordenada células selecionadas.

Além da severidade do estresse, as respostas das plantas variam de acordo com o tipo e duração do estresse, espécie, genética e idade da planta, estágio de desenvolvimento e tecido da planta que está sendo avaliado (RAMAKRISHNA; KUMARI, 2017; SCHNEIDER; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Essas respostas variadas tornam complexas as compreensões unificadas do metabolismo das plantas, e portanto justificam a realização de estudos que analisem possíveis combinações de estresses que ocorrem no cultivo das plantas no campo.

2.2 Déficit hídrico

O déficit hídrico é muito estudado, pois é considerado o mais frequente e o que mais interfere no crescimento e produtividade das plantas (ELDAKAK et al., 2013; FARNESE et al., 2016; FAROOQ et al., 2009; HABIBI, 2014; MA et al., 2017; SENTELHAS et al., 2015). Considera-se que a resposta das plantas frente ao estresse por déficit hídrico está bastante compreendida, mas tendo em vista que este estresse geralmente tem ocorrência simultaneamente a outros fatores potenciais causadores de estresse, bióticos ou abióticos, o estudo das interações entre os estresses combinados se mostra necessário (FAROOQ et al., 2009; PANDEY; RAMEGOWDA; SENTHILKUMAR, 2015; VILE et al., 2012).

Déficit hídrico é uma condição de disponibilidade de água insuficiente, causada por períodos sem irrigação, os quais podem ser intermitentes ou contínuos (TAIZ et al., 2017). Esse conceito não é fixo, pois podem existir situações de déficit hídrico mesmo

com água disponível no solo; no entanto alguma barreira impede que esta esteja disponível às plantas. Algumas situações podem ser físicas, como camadas de solo compactadas, químicas, em que altas concentrações de minerais podem deslocar a água do solo no sentido contrário ao das plantas, e de gradiente de pressão de vapor, em que a água é perdida pela planta pela transpiração.

Cabe ressaltar a importância de determinar o potencial de água dos solos, visto que o potencial hídrico mede a energia livre da água por unidade de volume para realizar trabalho (TAIZ et al., 2017) e, portanto, indica a disponibilidade de água para a planta. A umidade do solo, por sua vez, diz respeito à questão de quantidade de água, que nem sempre pode ser usada pela planta. Um solo saturado possui potencial hídrico próximo a zero e um solo seco tem potenciais negativos, que costumam variar de -1,5 a -4,0 MPa (TAIZ et al., 2017).

Do ponto de vista agrometeorológico considera-se uma condição de deficiência hídrica quando a demanda de consumo de água por uma planta supera a quantidade que ela tem disponível para usar. No entanto, fisiologicamente, déficit hídrico é toda condição abaixo da máxima hidratação, variando de acordo com a espécie e sua demanda naquele momento. Pode ser classificado de acordo com sua intensidade em leve, moderado e severo. Dependendo da intensidade do estresse hídrico, as plantas podem apresentar respostas e mecanismos de defesa diferenciados (SINGH; RAJA, 2011).

Vários efeitos são desencadeados pelo estresse de falta de água como a redução das atividades celulares e metabólicas e a fotoinibição (TAIZ et al., 2017). A fotoinibição é causada por danos ao fotossistema e inibição do fotossistema II, o que diminui a capacidade fotossintética das plantas (HUANG et al., 2013). Dois principais mecanismos podem acarretar reduções da fotossíntese, sendo que pode ocorrer inibição do potencial metabólico para a fotossíntese, ou ainda a diminuição do dióxido de carbono (CO₂) intercelular pela diminuição de trocas gasosas (WU; GONG; YANG, 2017; WU et al., 2018).

Os estômatos são muito importantes na resposta ao déficit hídrico, pois são diretamente afetados, uma vez que eles controlam a entrada de CO₂ na folha e a transpiração, que regula a temperatura da planta (MARTIN-StPAUL; DELZON; COCHARD, 2017). Se uma planta tem menos água disponível, ou se é submetida a uma demanda evaporativa muito alta, essa condição é sinalizada e, como forma de defesa, a planta fecha seus estômatos para evitar a perda de água. Assim, ocorrem menores trocas gasosas, maior respiração e menor fotossíntese (FAROOQ et al., 2009; YANG et al., 2014).

2.3 Estresse oxidativo

Diminuições na capacidade fotossintética acarretam menor proporção de energia utilizada na etapa fotoquímica e, portanto, há um excesso de energia de excitação dentro das células, ou seja, elétrons livres (MARTIN-StPAUL; DELZON; COCHARD, 2017). Quando não há dissipação dessa energia, esses elétrons reagem com o oxigênio e formam espécies reativas de oxigênio (EROs) (Anexo II). As principais EROs são: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]) e oxigênio singlete (¹O₂) (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017).

As EROs são essenciais à vida e possuem várias funções em níveis basais nas células (MITTLER, 2017). Elas permitem reações de biologia redox e regulação de processos, como proliferação celular, aclimatação ao estresse, principalmente funções de sinalização, e atuam como mensageiros secundários (MITTLER, 2017; SINGH et al., 2019). Entretanto, quando há algum fator estressante atuando sobre a planta, pode ocorrer um desequilíbrio na produção das EROs e essas produzidas em excesso se tornam citotóxicas, capazes de causar danos como peroxidação de lipídios, danos em membranas e em proteínas estruturais (FAROOQ et al., 2009; GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017). Podem ser desencadeados, ainda, danos em pigmentos fotossintéticos (GILL; TUTEJA, 2010), os quais resultam em menor conteúdo de clorofila (WU; ZHANG, 2019).

Plantas sob déficit hídrico geralmente aumentam a atividade do seu metabolismo antioxidante, tentando controlar a concentração de EROs e minimizar os possíveis danos oxidativos. Isso porque a capacidade das plantas para enfrentar condições estressantes está relacionada a um eficiente sistema de defesa (SLABBERT; KRÜGER, 2014). Aumentos na atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), e superóxido dismutase (SOD) foram observadas em condições de estresse por déficit hídrico (TANG et al., 2017; WANG et al., 2016; XING et al., 2016).

Esse metabolismo antioxidante é um sistema de desintoxicação para eliminação de xenobióticos (BENEKOS et al., 2010), assim como para neutralização das EROs produzidas e é formado por enzimas e compostos não-enzimáticos (BARBOSA et al., 2014; CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016b; GILL; TUTEJA, 2010). As principais enzimas antioxidantes são: SOD, APX, glutatona peroxidase (GPX), CAT, guaiacol peroxidase (POX), glutatona redutase (GR) e os compostos não-enzimáticos formados principalmente por: ascorbato, glutatona, β -caroteno, α -tocoferol, prolina (Anexo II).

A prolina, além de ser um composto antioxidante que atua eliminando o excesso de energia do transporte de elétrons e protegendo as plantas contra danos causados pelas EROs (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014; SZABADOUS; SAVOURÉ, 2010). É também um soluto orgânico, que atua como osmorregulador que é acumulado em condições de déficit hídrico (ASHRAF et al., 2018; TAIZ et al., 2017). A acumulação desse aminoácido promove a retenção de água celular pela redução do potencial hídrico da célula, mantendo o turgor celular (DONG et al., 2019; KIDO et al., 2013; TAIZ et al., 2017). A prolina tem a sua concentração aumentada no vacúolo e no citosol e, assim, mantém o equilíbrio osmótico da célula com o meio circundante (IQBAL et al., 2014; KHAN et al., 2015; REDDY et al., 2015; SINGH et al., 2015; TAIZ et al., 2017), auxiliando a planta na proteção contra estresses (BLUM, 2017; PER et al., 2017; ZHANG et al., 2017a). É um osmólito que mantém o turgor da célula (DONG et al., 2019; KIDO et al., 2013).

Outro composto geralmente produzido pelas plantas em condição de estresse é o óxido nítrico. Esse é considerado uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), encontrado na forma de gás (NABI et al., 2019), e atua ativando mecanismos de defesa das plantas frente à estresses, detoxificando EROs e minimizando seus efeitos prejudiciais (FERREIRA et al., 2011; LIPTON et al., 1993; ZOTTINI et al., 2002).

Quando a planta possui um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a atividade antioxidante, está em uma condição conhecida como homeostase redox (CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016a), enquanto que quando há um desbalanço entre a concentração de EROs e a atividade antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017).

A produção de EROs e a resposta das plantas ao estresse por déficit hídrico depende da duração desse estresse assim como do estágio fenológico da planta (BUEZO et al., 2019; SCHNEIDER; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). Da mesma forma, danos decorrentes da incidência de doenças serão mais ou menos prejudiciais, dependendo do estágio de desenvolvimento das plantas, e da sua condição metabólica para enfrentar essas adversidades.

2.4 Xenobióticos

A incidência de doenças é um fator de estresse biótico capaz de causar alterações no metabolismo secundário das plantas e é uma das principais responsáveis pela redução da produtividade da soja (BERGER-NETO et al., 2017). Como estratégia de manejo recomenda-se o manejo integrado, que engloba além de práticas de cultivo preventivas à ocorrência de doenças, o uso de controle químico com fungicidas que é uma prática muito utilizada (FIGUEIREDO et al., 2019; GARCIA et al., 2020).

Os fungicidas são substâncias químicas, de origem natural ou sintética, que protegem as plantas da penetração, ou posterior desenvolvimento de fungos patogênicos (REIS; REIS; CARMONA, 2021). Alguns desses compostos podem absorvidos e acumulados pelas plantas e muitos podem ter ação fitotóxica (CICERO et al., 2015).

Fitotoxicidade é a propriedade que o composto fungicida possui capaz de injuriar a planta, podendo causar efeitos danosos como a redução do crescimento da planta, crestamento foliar, queda de flores e frutos, redução da produção, enrolamento e bronzeamento foliar (REIS; REIS; CARMONA, 2021). A fitotoxidez geralmente é considerada uma característica indesejável, nem sempre possível de ser evitada no desenvolvimento de um novo fungicida (REIS; REIS; CARMONA, 2021).

Há relatos de fitotoxicidade de fungicidas à base de trifloxistrobina e protioconazole na cultura da soja e a evidência é de que a ação fitotóxica esteja envolvida com a acumulação de EROs nas células (MARQUES, 2017). A ação tóxica pode estar relacionada também com a adição de adjuvantes, como é o caso do óleos minerais ou vegetais, uma vez que são aditivos utilizados para melhorar a penetração dos produtos aplicados (QUEIROZ; MARTINS; CUNHA, 2008; NASCIMENTO et al., 2012; VARGAS; ROMAN, 2006).

Os adjuvantes não são os causadores da fitotoxidez (GALVÃO et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2012), porém, como facilitam a penetração dos defensivos, podem desencadear esses sintomas. Em um estudo a adição de óleo de soja, recomendado para uso com o fungicida (trifloxistrobina + protioconazole + bixafem), resultou em 5,25% de fitotoxidez, percentual igual ao da testemunha, ressaltando que a aplicação foi realizada em condições adequadas segundo a recomendação (GALVÃO et al., 2021). Também não foi observado efeito de fitotoxicidade em associações de óleos vegetais e fungicidas em outro estudo com a cultura da soja (NASCIMENTO et al., 2018).

Alguns fungicidas, como por exemplo o multissítio oxiclureto de cobre (Cu) e o triazol tem potencial de fitotoxidez dependendo do pH da calda. Assim, quando o pH da calda é menor que 5, os íons de Cu do oxiclureto são hidrolisados e liberados, tornando-se Cu solúvel na solução, que pode ser absorvido pela planta e tem potencial de causar fitotoxidez (QUEIROZ; MARTINS; CUNHA, 2008).

Outro fator que também pode influenciar a ocorrência de fitotoxidez é a condição ambiental no momento da aplicação. Aplicações em temperaturas mais altas e baixa umidade relativa do ar podem ocasionar amarelecimento e necrose dos espaços internervurais das folhas de soja (REIS; REIS; CARMONA, 2021).

Os fungicidas, assim como demais pesticidas aplicados, são consideradas substâncias xenobióticas. Isso porque essas substâncias são estranhas às plantas, ou seja, substâncias químicas artificiais, não formadas naturalmente (BHAVANI; PARAMESWARI; MAHESWARI, 2021). Segundo esses autores, a palavra deriva do grego, e significa diferente do sistema vivo, sendo “xeno” o significado de incomum e “biótico” indica vida.

Considerando que apesar do fungicida ter sua função relevante, se quando aplicado em condições adversas pode ter potencial fitotóxico, é importante atentar para o manejo da cultura no campo e observar a necessidade de aplicação de acordo com as condições favoráveis para o desenvolvimento de doenças na cultura da soja. É importante a realização de aplicações preventivas de fungicida e, além disso, observar as condições para a aplicação. Se as plantas estiverem enfrentando um período de falta de água e receberem xenobióticos, seu sistema de defesa pode entrar em *trade off* e isso pode refletir em reduções na produtividade.

Um bom controle de patógeno foi observado em um estudo com aplicação de fungicida em plantas de soja sob déficit hídrico (STEFANELLO et al., 2016). Esses autores observaram um maior número de dias para o aparecimento da primeira pústula quando plantas em déficit hídrico receberam a aplicação do fungicida. Nesse caso, a hipótese é de que o controle mais efetivo tenha decorrido da maior concentração interna de fungicida devido ao menor potencial hídrico dessas plantas.

Há também uma indicação de que as alterações decorridas do déficit hídrico, principalmente o espessamento da cutícula, dificultem a penetração de fitopatógenos (TAIZ et al., 2017), o que também pode ter influenciado nessa resposta. Uma maior espessura de cutícula também pode ser uma barreira para a entrada de substâncias na

planta, e pode acarretar em menor absorção xenobiótica (SATCHIVI et al., 2001). No entanto, xenobióticos lipofílicos têm alta afinidade pela parede celular e são rapidamente absorvidos e muito retidos pela cutícula (CHAMEL; VITTON, 1996; SATCHIVI et al., 2001) e, portanto, terão maior concentração na cutícula quanto mais espessa e maior for o depósito de ceras (FORSTER; ZABKIEWICZ; RIEDERER, 2004; FORSTER, 2006).

Compostos hidrofílicos atravessam a cutícula e movem-se pela cutícula até o apoplasto por vias aquosas (CHAMEL; VITTON, 1996; SATCHIVI et al., 2001) e a sua absorção diretamente relacionada com a penetração passiva (FORSTER; ZABKIEWICZ; RIEDERER, 2004; FORSTER, 2006). Essa absorção e translocação diferenciadas dizem respeito ao coeficiente de partição dos compostos em octanol/água, em que valores de $\log K_{ow}$ de 5 e 2 proporcionam a maior absorção e translocação, respectivamente. Compostos são considerados hidrofílicos quando possuem um $\log K_{ow} = -2$, intermediários com $\log K_{ow} = 2$, e hidrofóbicos com $\log K_{ow} = 4$ (SATCHIVI et al., 2001). Assim, quanto maior o K_{ow} , maior a interação com as ceras, os compostos entram nesses locais com facilidade, se concentrando e causando um acúmulo, que pode resultar em fitotoxidez.

Com o uso inadequado das tecnologias, considerando doses menores, momentos de aplicação, os produtos vão perdendo sua eficiência, e como alternativa é utilizada a mistura de fungicidas com diferentes grupos químicos e modos de ação. Alguns produtos comerciais já vêm com uma fórmula complexa, contendo misturas, como por exemplo triazóis com estrobilurinas. Nesse caso, as estrobilurinas atuam na germinação dos esporos e processo de infecção (COSTA; COTA, 2009), enquanto que os triazóis são mais efetivos no controle do fitopatógeno em estádios mais avançados, como na colonização (SILVA et al., 2021) e a ação conjunta aumenta o espectro de controle.

A adição do mancozebe ao programa de fungicida na cultura da soja pode ser uma estratégia, apesar de esse ter baixo desempenho no controle de algumas doenças, quando utilizado isolado e em comparação com os demais fungicidas (LANGENBACH et al., 2016). O mancozebe é um fungicida ditiocarbamato, não sistêmico, utilizado há

anos em várias culturas para controle de diversas doenças (FANJUL-BOLADO et al., 2021). É protetor, permanecendo na superfície das folhas, como uma proteção fungitóxica, evitando a infecção do hospedeiro pelo fitopatógeno (BALARDIN et al., 2017). Tem ação multissítio e, portanto, retarda a ocorrência da resistência de fungos a fungicidas e contribui para maior eficiência de controle da doença (KNEBEL et al., 2019; NETTO et al., 2020; REIS; ZANATTA; REIS, 2020).

Misturas de fungicidas sítio-específicos e multissítios favorecem o controle da doença, pois multissítios apresentam ação letal e, então, agem sobre os fitopatógenos não controlados pelo fungicida sítio-específico (BALARDIN et al., 2017). A obtenção de maiores produtividades de soja com a mistura de fungicidas sítio-específicos com o multissítio pode ser reflexo da menor incidência da doença, mas pode estar relacionada também com alguns efeitos fisiológicos do fungicida pelo efeito mitigador do mancozebe na fitotoxicidade causada por outros fungicidas (ALVES; JULIATTI, 2018; KNEBEL et al., 2019; NETTO et al., 2020).

Esses benefícios podem também ser decorrentes do efeito nutricional, visto que esse fungicida contém teores de zinco (Zn) e manganês (Mn) em sua constituição. A nutrição com micronutrientes tem importante ação benéfica nos mecanismos de defesa das plantas relacionada com a eliminação de EROs pelo sistema antioxidante (TAVANTI et al., 2021). Essa ação pode ser relacionada com as diferentes isoformas da SOD. Essa enzima antioxidante possui isoformas com diferentes cofatores metálicos: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (BERWAL; RAM, 2018; MOSA et al., 2018).

A aplicação de mancozebe resultou em incrementos nas concentrações de Mn, Zn e enxofre (S) em folhas de soja (MARQUES, 2017). O mancozebe é um composto orgânico de S, e possui Mn e Zn em sua composição. Esses incrementos explicam o “efeito fisiológico” observado pela aplicação do mancozebe, assim como o aumento de clorofila das plantas. Esse efeito pode ser decorrente dos mecanismos de resistência que conferem às plantas (MA et al., 2017; SANTOS et al., 2017; TAVANTI et al., 2021) relacionado às isoformas da SOD, como também pode estar relacionado com as demais

funções desses micronutrientes na planta. O Mn é responsável pela modulação da fotossíntese e está envolvido em uma série de reações redox (TAVANTI et al., 2021), e o Zn tem atuação na ativação de enzimas dehidrogenases, isomerases e polimerases, na síntese de proteínas, na fotossíntese e na regulação do crescimento (LEE et al., 2020).

Fungicidas do grupo químico das estrobilurinas também têm mostrado efeitos fisiológicos nas plantas (COSTA; COTA, 2009). Nesse sentido, alguns efeitos fisiológicos foram observados em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) tratadas com fungicida à base de piraclostrobina e epoxiconazole, sendo observadas mudanças fisiológicas, no crescimento das plantas, níveis de clorofila, retardo na senescência de folhas, além de modificações bioquímicas, como aumento nos níveis de óxido nítrico e atividade de enzimas antioxidantes (CAT, POX e SOD) (AMIN; JAMPALA, 2018).

2.5 Bioestimulantes

Além dos efeitos mitigadores de fitotoxicidade observados pelo fungicida mancozebe, outras estratégias podem ser utilizadas para minimizar o impacto dos estresses nas plantas. Uma alternativa que vem sendo proposta é o uso de bioestimulantes (CHAVARRIA; SCHNEIDER; MÜLLER, 2021; IZQUIERDO; PINTOS, 2021; POSMYK; SZAFRANSKA, 2016; SCHNEIDER et al., 2020; SHUKLA et al., 2019; STAYKOV et al., 2020; UGENA et al., 2018).

Bioestimulantes são produtos formulados capazes de melhorar o desempenho das plantas, em decorrência das propriedades emergentes do complexo de constituintes nesse composto (YAKHIN et al., 2017). A definição de bioestimulantes é variável pois existe uma diversidade muito grande de materiais disponíveis no mercado utilizados na composição desses produtos, dentre as quais incluem algas, bactérias, fungos, ácidos húmicos e fúlvicos (PAULA et al., 2022). Essa ampla gama de moléculas dificulta ainda identificar precisamente quais são os mecanismos ativados pelos bioestimulantes (BULGARI et al., 2014).

As características ideais de um bioestimulador incluem a não toxicidade aos animais e ambiente, de fácil absorção pelas plantas e fácil penetração nos compartimentos das células, de origem natural ou facilmente desenvolvido em laboratório, não caro, capaz de ser dissolvido em diferentes solventes, melhorar a condição das plantas em situações de adversidades (POSMYK; SZAFRANSKA, 2016).

Ao minimizar os danos decorrentes do estresse, os bioestimulantes podem atuar em processos metabólicos das plantas, contribuindo para que expressem seu potencial produtivo (du JARDIN, 2015; POSMYK; SZAFRANSKA, 2016; UGENA et al., 2018; YAKHIN et al., 2017). Esses compostos interagem com as cascatas de sinalização da planta, podendo assim reduzir os danos causados pelo estresse (BROWN; SAA, 2015). As evidências apontam para a atuação desses compostos na eliminação de EROs, por meio da potencialização do sistema antioxidante da planta, representado pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes e pela concentração aumentada de compostos antioxidantes não enzimáticos (SCHNEIDER et al., 2020; YAKHIN et al., 2017).

O benefício do bioestimulante está diretamente relacionado aos fotoassimilados que deixam de ser desviados para o metabolismo não produtivo em resposta à uma condição estressante (BROWN; SAA, 2015). Os bioestimulantes atuam incrementando o sistema radicial, proporcionando maior absorção de nutrientes (du JARDIN, 2015; SANTOS et al., 2017; YAKHIN et al., 2017). Além disso, a indução de crescimento da planta em decorrência da aplicação do bioestimulante pode estar relacionada com o aumento de aminoácidos e biossíntese de proteínas (BULGARI et al., 2014).

Assim é possível melhorar a eficiência desses produtos quando aplicados no estágio vegetativo das plantas e em condições estressantes, quando esses atuam como mitigadores de estresse (FRASCA, 2019). Os bioestimulantes atuam aumentando a produtividade e a qualidade de maneira sustentável para o sistema de produção (ZULFIQAR et al., 2019). Esses autores indicam que os bioestimulantes têm origem natural e os seus constituintes estão nas plantas. Dessa forma, considerando também a definição de xenobiótico, entende-se que devido à sua constituição os bioestimulantes não são considerados xenobióticos.

3 CAPÍTULO I

Mancozebe associado ao déficit hídrico: respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de soja

3.1 Resumo

O mancozebe é utilizado associado com outros princípios ativos. Essas aplicações muitas vezes ocorrem durante condições ambientais desfavoráveis, como é o caso do déficit hídrico. O objetivo do estudo foi analisar se a aplicação do fungicida mancozebe modifica a fisiologia e a bioquímica de plantas de soja sob estresse por déficit hídrico. O experimento foi conduzido no ano de 2020, em ambiente protegido, em delineamento de blocos casualizados, com três repetições. As plantas de soja foram cultivadas em vasos, nos quais estavam instalados sensores de potencial hídrico do solo. Foram realizadas avaliações fisiológicas e bioquímicas. Observou-se que plantas que receberam a aplicação do fungicida mancozebe apresentaram 1 °C a mais do que as plantas do controle. A condutividade elétrica, o dano de membrana e a peroxidação lipídica foram maiores em plantas sob déficit hídrico, enquanto que a aplicação do mancozebe não causou alterações em danos oxidativos. Não foram observados efeitos deletérios do mancozebe como xenobiótico quando aplicado na dose recomendada para a cultura da soja, mesmo em condições de déficit hídrico. As plantas apresentaram efeitos deletérios causados pelo déficit hídrico, principalmente com relação ao estresse oxidativo induzido pela falta de água. Foram evidentes os sintomas visuais de perda de turgescência, os quais refletiram nos metabolismos oxidativo e antioxidante, sendo intensamente afetados, embora poucos reflexos foram confirmados pelos aspectos fisiológicos. A combinação de dois estresses (déficit hídrico e xenobióticos) não resultou na maximização de efeitos negativos. Muitas vezes a resposta da planta para estresses simultâneos pode ser incrementada, mas a planta reage a cada nova situação de diferentes estresses combinados de forma única.

Palavras-chave: 1. Xenobiótico. 2. Fungicida. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Estresse oxidativo. 5. Potencial da água do solo.

3.2 Introdução

A cultura da soja [*Glycine max* L. (Merrill)] tem considerável importância social e econômica, pois é amplamente produzida em várias regiões do país, bastante utilizada na alimentação humana e animal, e apresenta grande contribuição no Produto Interno Bruto (PIB) do país (MAPA, 2020). Seu cultivo está constantemente exposto a condições adversas causadas por fatores bióticos ou abióticos, dentre os mais comuns podemos citar as altas temperaturas, déficit hídrico, ataque de pragas e doenças, e exposição à xenobióticos.

O déficit hídrico é um dos estresses de principal ocorrência, capaz de causar alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas (MA et al., 2017; NABI et al., 2019; KOSAR et al., 2021). É considerado o estresse que mais causa perdas de produtividade das culturas (DUC; CSINTALAN; POSTA, 2018). Assim, estratégias vem sendo usadas para mitigar o estresse por falta de água, como o desenvolvimento de genes de tolerância, tecnologias e o uso de produtos com alguma ação benéfica podendo ser alguns fungicidas (KANUNGO et al., 2021).

A aplicação foliar de fungicidas é utilizado como um dos métodos de controle mais efetivo e imediato, prevenindo ou controlando patógenos nas plantas e o número de aplicações na cultura tem aumentado nos últimos anos, sendo que são várias moléculas diferentes utilizadas (ZAMBIAZZI et al., 2018). Considerando que nos últimos anos não foram lançados fungicidas com novos modos de ação, e que aumenta a preocupação em relação à indução de resistência e, ainda, levando em conta o uso constante e repetitivo das mesmas moléculas de ação fúngica, a utilização do mancozebe surge como uma alternativa tanto para reduzir o risco de resistência, como para aumentar a eficiência de controle de doenças fúngicas, principalmente para ferrugem-asiática (SILVA et al., 2015; GODOY et al., 2016).

Sabe-se que o mancozebe, assim como os demais pesticidas, é um composto xenobiótico, pois é um produto aplicado exogenamente e estranho para o metabolismo da planta. Assim, a planta ao receber essa aplicação pode desencadear mecanismos de defesa para combater essa molécula ou minimizar qualquer dano que essa possa refletir. Plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) expostas à aplicação de mancozebe apresentaram um aumento nos seus antioxidantes, sugerindo a ativação desses mecanismos de defesa (PEREIRA et al., 2014).

No entanto, a escassez da literatura sobre os efeitos do mancozebe no metabolismo das plantas, e a intensificação do seu uso como alternativa ao manejo de resistência dos fungos, e seu possível efeito fisiológico evidenciam a importância do desenvolvimento de pesquisas para elucidar os mecanismos interativos entre xenobióticos e déficit hídrico em soja. A maioria dos estudos objetiva avaliar a

eficiência de controle proporcionada pelos fungicidas (DELANEY et al., 2018; MOLINA et al., 2019; BANDARA et al., 2020) e seus efeitos residuais (FANJUL-BOLADO et al., 2021).

Assim, pouco se sabe sobre a fitotoxicidade desses xenobióticos, a geração de estresse oxidativo e o metabolismo antioxidante envolvido. Portanto, com base na hipótese de que o mancozebe minimiza efeitos estressantes causados pelo déficit hídrico, o objetivo do estudo foi avaliar se a aplicação de mancozebe modifica a fisiologia e a bioquímica de plantas de soja sob estresse por déficit hídrico.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Material vegetal e local do experimento

Foi utilizada a cultivar DM 5958 IPRO, caracterizada pelo ciclo super-precoce (grupo de maturação 5.8), flor de coloração roxa, hábito de crescimento indeterminado e porte médio. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Universidade de Passo Fundo, RS.

Essas plantas se desenvolveram em ambiente controlado, numa câmara de crescimento, sendo mantidas 14 horas de iluminação artificial, com a utilização de lâmpadas fluorescentes e LED intercaladas, de cor branca (temperatura de cor 6400K), e fluxo luminoso de 2.790 lumens. A densidade de fluxo de fótons foi medida com o ceptômetro (ACCUPAR LP-80, DECAGON), sendo obtida a densidade de 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A temperatura do ar e a umidade relativa do ar foram medidas com o datalogger de umidade e temperatura digital (modelo HT-70, Instrutherm), sendo observados valores médios de 64,8% e 25,1 °C. O valor máximo encontrado foi de 27,2 °C para temperatura, e 79,4% para umidade. Os valores mínimos foram 37,5% e 23,0 °C.

3.3.2 Delineamento experimental e tratamentos

Os tratamentos, delineados em esquema bifatorial, foram o estresse por déficit hídrico (com e sem irrigação), na ausência e presença de xenobiótico (fungicida Unizeb Gold[®]) (Figura 1). O experimento foi delineado em blocos casualizados, com três repetições.

Figura 1 - Plantas de soja irrigadas com (A) e sem (B) aplicação de mancozebe, e em déficit hídrico com (C) e sem (D) aplicação de mancozebe.



3.3.3 Procedimentos experimentais

Uma mistura contendo solo e substrato (Tabela 1) na proporção de 2:1 foi preparada, sendo bem homogeneizada em uma lona, e colocada em vasos de 11 L. Cada

vaso recebeu 8.200 kg dessa mistura, sendo enchido até a metade da altura do vaso, acomodado o sensor para medição do potencial da água do solo, centralizado e horizontalmente (Figura 1) e, posteriormente, colocada a outra metade da mistura.

Tabela 1 - Características químicas e físico-hídricas do meio de crescimento. Passo Fundo, RS, 2020

CTC_{pH 7,0} cmolc/dm³¹	23,21	H⁺ cmolc/dm³	6,19	B mg/dm³	0,24
CTC_{efetiva} cmolc/dm³	17,02	Ca²⁺ cmolc/dm³	12,76	Cu²⁺ mg/dm³	1,96
MO g/dm³	62,12	Mg²⁺ cmolc/dm³	3,48	Fe²⁺ mg/dm³	211,19
P-Rem mg/L	12,36	K⁺ cmolc/dm³	0,56	Mn²⁺ mg/dm³	57,46
pH em CaCl₂	4,77	Na⁺ cmolc/dm³	0,22	Zn²⁺ mg/dm³	2,41
pH em H₂O	5,46	P (1) mg/dm³	105,03	V%	73,33
pH em SMP	5,76	P (3) mg/dm³	50,79	Ds g/cm³	0,97
H + Al cmolc/dm³	6,19	SO₄²⁻ mg/dm³	55,54	Pt m³/m³	0,62

¹CTC: capacidade de troca de cátions; MO: matéria orgânica; P-Rem: fósforo remanescente; pH: potencial hidrogeniônico; CaCl₂: cloreto de cálcio; H₂O: água; H+Al: acidez potencial; H⁺: acidez não trocável; Ca²⁺: cálcio; Mg²⁺: magnésio; K⁺: potássio; Na⁺: sódio; P: fósforo; SO₄²⁻: íon sulfato (enxofre); B: boro; Cu²⁺: cobre; Fe²⁺: ferro; Mn²⁺: manganês; Zn²⁺: zinco; V%: saturação de bases; Ds: densidade do solo; Pt: porosidade total.

O sensor de potencial da água no solo utilizado foi o modelo 253-L da Campbell Scientific, fabricado pela Watermark. É um dispositivo de resistência elétrica que estima o potencial da água no solo. Os sensores foram conectados a multiplexadores de séries do tipo AM16/32 e esses, por sua vez, conectados ao registrador de dados (datalogger CR1000X), o qual coleta e armazena os dados a partir da programação enviada por meio do software PC200W.

Após a preparação do solo e sensor nos vasos, o solo foi umedecido gradualmente com dois litros de água para homogeneizar a umidade na região ao redor

do sensor. Foram depositadas oito sementes de soja em cada vaso, numa profundidade de 3 cm, aproximadamente. Após a germinação e emergência foi realizado o desbaste das plantas, sendo mantidas quatro em cada vaso

Com os dados coletados pelos sensores e o ajuste da curva de retenção de água no solo foram estimados os potenciais no momento da aplicação dos xenobióticos, sendo: Irrigado controle $-0,005 \pm 0,001$ MPa; Irrigado mancozebe $-0,009 \pm 0,004$ MPa; Déficit hídrico controle $-0,184 \pm 0,046$ MPa; Déficit hídrico mancozebe $-0,168 \pm 0,034$ MPa.

As plantas receberam a mesma quantidade de água até 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). Nesse momento foram submetidas às diferentes disponibilidades de água: aquela irrigada continuou a receber irrigação de acordo com a necessidade da cultura, enquanto que o tratamento submetido ao déficit hídrico teve restrição de água durante o período de sete dias.

Quando as plantas submetidas ao déficit hídrico se encontravam visivelmente murchas, com a turgescência impactada, foi realizada a aplicação do xenobióticos. A aplicação foi realizada utilizando um pulverizador costal de pressão constante, pressurizado com CO₂, equipado com uma barra de 1,5 m e três pontas jato plano defletor, modelo TT 11002, espaçadas de 50 cm. O volume de aplicação foi de 150 L/ha e pressão de 2 bar.

A utilização do fungicida, pensando em um manejo de campo, tem o objetivo de atuar como um preventivo, considerando que as plantas nesse estágio de desenvolvimento costumam estar ainda saudas, sem apresentar sintomas de doenças. O fungicida, tem nome técnico mancozebe e formulação em grânulos dispersíveis em água (2 kg ha⁻¹). Os ingredientes ativos são o mancozebe (etileno bis-ditiocarbamato de manganês e zinco), na concentração de 750 g/kg (75% m/m), e outros ingredientes, na concentração de 250 g/kg (25% m/m). Este produto tem efeito protetor residual, atua na

superfície da planta e forma uma camada protetora tóxica na superfície (REIS; REIS; CARMONA, 2021) e tem ação multissítio, com amplo espectro de controle (SILVA et al., 2015).

Após uma hora da aplicação do mancozebe iniciaram-se as avaliações das plantas, sendo determinadas variáveis fisiológicas e coletado material para quantificações bioquímicas, as quais ocorreram posteriormente. As primeiras análises realizadas foram aquelas não destrutivas e, em seguida, foram coletadas amostras para as avaliações bioquímicas. Posteriormente foram coletados trifólios para detecção *in situ* do peróxido de hidrogênio e outros trifólios para retirada de discos foliares, para estimativa do conteúdo relativo de água, e para quantificação dos danos do estresse (dano de membrana e condutividade elétrica), pois essa retirada de material causa injúrias, as quais poderiam interferir nas avaliações.

3.3.4 Avaliações fisiológicas

A condutância estomática ($\text{mmol/m}^2\text{s}$) foi avaliada com um porômetro foliar (Marca: Delta-T Devices, Modelo: AP4). Foram realizadas duas medições em três plantas de cada vaso, no sexto folíolo totalmente expandido, totalizando seis medidas por vaso.

A temperatura da planta ($^{\circ}\text{C}$) foi medida no folíolo central de trifólios localizados nos três terços da planta (superior, médio e inferior). Foi utilizado um termômetro digital infravermelho, com emissividade de 0,95 (Marca: RayTemp, Modelo: 8).

Os Conteúdos de clorofila *a*, *b* e total foram medidos no folíolo central do quarto trifólio totalmente expandido, por meio de um clorofilômetro (Marca: Falker, Modelo: ClorofiLog). A utilização desse equipamento permite a obtenção do índice de clorofila Falker (ICF), que é um valor relativo do conteúdo de clorofila e é baseado em correlações de absorvância e reflectância.

A fluorescência da clorofila e o rendimento quântico do fotossistema II (mmol CO₂/mmol fótons) foram avaliados no folíolo central do quarto trifólio totalmente expandido, em duas plantas de cada vaso, com a utilização de um fluorômetro portátil (Marca: Fluorpen, Modelo: FP-100).

O conteúdo relativo de água (%) das plantas foi estimado pela metodologia de Cavalcanti et al. (2004). O quinto trifólio totalmente expandido de cada planta do vaso foi coletado com auxílio de uma tesoura e desse foram retirados 30 discos foliares, com auxílio de um vazador, com diâmetro de 1 cm. Estes foram então imediatamente pesados em balança analítica, e então colocados imersos em água destilada durante sete horas, sob luz de 300 µmol/ms e temperatura de 25 °C. Após decorrido esse tempo, os discos foram retirados da água, levemente enxugados em um papel toalha, e então pesados novamente. Foram colocados em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar, sob temperatura de 60 °C até massa constante e, novamente realizada a pesagem dos mesmos. Com os dados das três pesagens foi possível estimar o conteúdo relativo a partir da fórmula: Conteúdo relativo de água (%) = [(massa discos frescos – massa discos secos) / (massa discos túrgidos – massa discos secos) * 100].

3.3.5 Avaliações bioquímicas

O dano de membrana foi estimado a partir da metodologia proposta por Cavalcanti et al. (2004). Esse método avalia o dano oxidativo a partir da perda de eletrólitos. Para a análise foi coletado o sexto trifólio totalmente expandido de todas as plantas do vaso, e destes retirados 20 discos foliares de um centímetro, e colocados em tubos falcon contendo 20 mL de água destilada. Os tubos foram mantidos sob agitação constante no período de 12 horas, sob temperatura de 25 °C. Então realizou-se a medição da condutividade hidráulica da água com auxílio de um condutivímetro digital (Marca: Akso, Modelo: AK52). Esses tubos foram colocados em banho-maria por uma hora, numa temperatura de 95 °C, com a finalidade de romper todas as membranas e liberar todos os eletrólitos. Após retirados do banho-maria, foram deixados sob temperatura ambiente, e quando estabilizaram uma nova leitura de condutividade

elétrica foi realizada. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do dano de membrana, sendo: Dano de membrana (%) = [(leitura inicial – leitura final) * 100].

Como uma metodologia alternativa, foi medida também a condutividade elétrica. Assim, dos mesmos trifólios coletados para a análise anterior, foram retirados com um furador de diâmetro de um centímetro, 25 discos foliares, os quais foram colocados em tubos falcon com 20 mL de água destilada, e mantidos durante 24 horas. Após esse período foi realizada a leitura da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), com o condutivímetro digital (Marca: Akso, Modelo: AK52).

A peroxidação dos lipídios foi estimada a partir da concentração de malondialdeído (MDA), de acordo com a metodologia de Heath; Packer (1968). O MDA é o produto final da peroxidação lipídica das membranas (SAHIN et al., 2018). Essa variável permite uma indicação do dano de membrana em células, uma vez que quantifica as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no tecido. Em um tubo Falcon foi adicionado 400 μL de extrato enzimático, 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. Os tubos foram vedados com plástico filme e incubados em banho-maria, durante 15 minutos, a 100 °C. Após esse período foram retirados, e mantidos na temperatura ambiente até esfriarem, e então centrifugados (Marca: Eppendorf, Modelo: 5430 R) a 2000 rpm, força G de 1000, durante 15 minutos. O conteúdo do tubo falcon foi cuidadosamente vertido em uma cubeta de 1 mL e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series), em comprimento de onda de 535 nm. O conteúdo de MDA (mmol/mg proteína) das plantas foi calculado a partir da equação gerada através da curva padrão com diferentes concentrações de MDA.

A quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorreu em duplicatas, utilizando placa de Elisa, de acordo com o método descrito por Loreto; Velikova (2001). Em cada poço foram adicionados 50 μL de extrato enzimático, 50 μL de iodeto de potássio (1 M) e 100 μL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0). A absorbância foi lida em 390 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro (Marca: Biosystems,

Modelo: Sinergy h1). Para o cálculo da concentração do H₂O₂ (μmol/mg proteína) considerou-se um fator de correção de 0,54.

O peróxido de hidrogênio também foi quantificado qualitativamente a partir da técnica de detecção *in situ* do H₂O₂, de acordo com a metodologia de Thordal-Christensen et al. (1997). Coletou-se cuidadosamente o folíolo central do sétimo trifólio totalmente expandido, e colocou-se em uma placa de petri com uma solução tampão de MES (10 mM, pH 5,8) e DAB (tetraidracloro de diaminobenzidina – 3.3' diaminobenzidina). As placas foram incubadas durante 12 horas em luz de 300 μmol/m² s, e temperatura de 25 °C. Os folíolos foram retirados e colocados em álcool 95% em ebulição, durante 10 minutos para remoção da clorofila. Assim a visualização do H₂O₂ é facilitada, e fotografias foram feitas para registrar a marcação da espécie reativa de oxigênio no tecido.

A concentração de superóxido (O₂^{•-}) foi determinada em duplicatas de acordo com a metodologia de Chaitanya; Naithani (1994). Preparou-se uma mistura de reação 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, na qual foram adicionados 100 μL do extrato enzimático. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series) a 540 nm, a cada 20 segundos, durante três minutos, e a concentração de O₂^{•-} (mmol mg proteína/min) determinada a partir da subtração da absorbância final (aos 3 minutos) pela inicial (aos 0 segundos).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi quantificada pela metodologia de Nakano; Asada (1981). A análise foi realizada com duplicatas e uma mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 6,8), peróxido de hidrogênio (1mM) e ascorbato (0,8 mM). Em cubetas de 1 mL foram adicionadas 975 μL da mistura de reação e 25 μL de extrato, homogeneizados, e lida a absorbância em espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series), comprimento de onda de 290 nm, durante cinco minutos, a cada vinte segundos. A atividade da enzima (μmol mg proteína/min) foi calculada com base na capacidade de oxidação ascorbática em um minuto, considerando-se o coeficiente de extinção de 2,8 mM/cm.

A enzima catalase teve sua atividade (mmol mg proteína/min) determinada pelo método de Cakmak; Marschner (1992), com pequenas variações. Este método avalia a atividade da enzima com base na capacidade de decomposição do H₂O₂. A análise foi realizada em duplicata, e uma mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 6,8) e peróxido de hidrogênio (20 mM). Em cubetas de quartzo de 3 mL foram homogeneizados 1950 µL da mistura de reação com 50 µL do extrato enzimático e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Marca: Spectrum Meter; Modelo: SP-2000UV) equipado com lâmpada UV, a 240 nm, durante cinco minutos, a cada vinte segundos. Para o cálculo considerou-se o coeficiente de extinção de 36 M/cm (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima em reduzir o azul de nitro-tetrazólio, de maneira fotoquimicamente, conforme proposto por Del Longo et al. (1993), sendo que 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). A análise foi realizada em duplicatas, e preparou-se uma mistura de reação com tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,8), metionina (13 mM), azul de nitro-tetrazólio (75 µM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, a 0,1 mM) e riboflavina (2 µM). Em cubetas de 1 mL foram adicionados 960 µL dessa mistura, e homogeneizados com 40 µL de extrato enzimático. Essas amostras foram incubadas a 25 °C, expostas a uma lâmpada de 15W, durante 10 minutos. Após esse período foi realizada uma leitura pontual em espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series), em comprimento de onda de 560 nm. De acordo com os idealizadores do método, Giannopolitis; Ries (1977), essa leitura permite registrar a produção de azul de formazan, o que resulta da fotorrecuperação de azul de nitro-tetrazólio. O cálculo da atividade da SOD (unidade de SOD/mg proteína) levou em consideração a diferença entre a leitura dos brancos, do claro e escuro, ou seja, um mantido sob luz com as amostras, e outro incubado pelo mesmo período de tempo no escuro.

O conteúdo de tiois não proteicos é uma medida indireta, simples e barata para quantificar a glutatona. Neste trabalho adaptamos a metodologia de Griffith (1980). Em

tubos Falcon foram colocados 500 μ L de extrato enzimático e acrescentados 500 μ L de TCA a 10%. Os tubos foram colocados para centrifugar por 20 minutos a 2000 rpm e força G de 250 (Marca: Quimis; Modelo: Q222T). De cada tudo retirou-se 800 μ L do sobrenadante, e colocado para reação com 80 μ L de ácido 5,5''-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). Essa mistura foi colocada em uma cubeta 1 mL, para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Marca: Spectrum Meter; Modelo: SP-2000UV) a 412 nm. O conteúdo de tiois não proteicos (mmol/mg proteína) foi posteriormente calculado com base na equação obtida pela curva gerada a partir de padrões de cisteína.

A concentração de óxido nítrico foi avaliada indiretamente a partir da metodologia de Bracht; Ishii-Iwamoto (2003). Essa metodologia é utilizada para quantificar a quantidade de nitritos, podendo indicar a produção de óxido nítrico. Em tubos Falcon foram adicionados 500 μ L de extrato enzimático e 500 μ L de TCA a 50%. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 10 min, força G de 250 (Marca: Quimis; Modelo: Q222T). Então foram pipetados 500 μ L do sobrenadante, adicionados a 500 μ L de reagente de Griess, e realizada leitura da absorbância, em cubeta de 1 mL, em comprimento de onda de 540 nm (Marca: Spectrum Meter; Modelo: SP-2000UV). As concentrações de óxido nítrico (μ mol/mg proteína) dos tecidos foliares foram calculados com base na equação gerada através da curva com diferentes concentrações de solução de nitrito.

A determinação de prolina (μ mol/mg proteína) seguiu o princípio do método original proposto por Bates; Waldren; Teare (1973), porém com uma adaptação bem atual, que propõe um método bem mais rápido, eficiente, e mais ecologicamente correto (SHABNAM et al., 2015). O extrato enzimático previamente preparado foi acidificado com ácido sulfosalicílico, concentração de 3%, sendo uma proporção de 300 μ L de extrato, para 300 μ L de ácido. Esse novo extrato foi homogeneizado e pipetado o volume de 500 μ L para um tubo de ensaio com tampa. Nesse tubo foi adicionado 2 mL de solução ácida de ninhidrina (0,0625 g de ninhidrina em 15 mL de ácido acético glacial), fechado, homogeneizado e colocado em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos. Após esse período, foi colocado em gelo durante 10 minutos e feita a leitura

em cubeta de vidro de 3 mL, em 508 nm, no espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series).

Para determinação de proteínas (mg/mL) foi utilizado o método do comassie (BRADFORD, 1976). Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL de extrato enzimático e adicionados 900 µL de comassie. A mistura passou 10 segundos no vórtex, e foi colocada em cubeta de 1 mL para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Marca: Cecil, Modelo: CE 2021 2000 series), em comprimento de onda de 595 nm. Os valores foram calculados com base no fator de correção obtido pela curva com diferentes padrões de albumina.

Os últimos trifólios emitidos pela planta (sexto e sétimo trifólios) foram cuidadosamente coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Esse material foi posteriormente macerado em cadinhos com pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido. Então, homogeneizou-se esse material com oito vezes a sua massa com uma solução tampão (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico e fosfato monopotássico). Centrifugou-se numa rotação de 3000 rpm e força G de 2000, durante dez minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C (Marca: Eppendorf, Modelo: 5430 R). O sobrenadante foi pipetado e armazenado em eppendorfs a -80 °C (ultrafreezer) até a realização das análises. Esse extrato foi utilizado para as quantificações.

3.3.6 Análises estatísticas

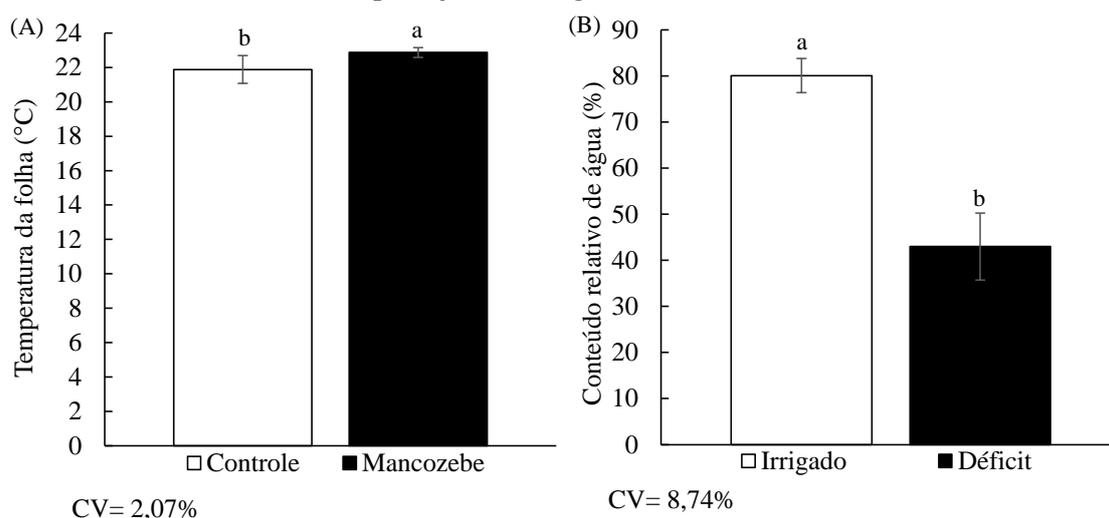
Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade de resíduos. As variáveis com distribuição dos resíduos não normal tiveram seus dados transformados por meio da raiz quadrada (peróxido de hidrogênio e óxido nítrico). A análise de variância foi realizada a partir do teste F, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas no software RStudio (R Core Team, 2018) e o pacote utilizado foi o ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014). A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, com a utilização do pacote car (FOX;

WEISBERG, 2020). Também foram feitas análises de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, com o uso do pacote corrplot, e análise multivariada utilizando o método de componentes principais, pelos pacotes FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008) e factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2020).

3.4 Resultados e Discussão

A temperatura da folha apresentou diferença apenas com relação às plantas que receberam a aplicação do mancozebe e as plantas do controle. Plantas que receberam a aplicação do fungicida mancozebe apresentaram 1 °C a mais do que as plantas do controle (Figura 2A).

Figura 2 - Temperatura da folha e conteúdo relativo de plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

Sob condições limitadas de falta de água a resposta das plantas C3, como é o caso da soja, costuma ser ainda mais proeminente, pois a planta evita o gasto de água pelo fechamento estomático, limitando assim seu arrefecimento e a assimilação da molécula de fungicida. Aumentos na temperatura foliar das plantas, decorrentes de estresses, podem resultar em alterações na biossíntese de pigmentos fotossintéticos, ou ainda, atuar na degradação desses pigmentos (AGHAIE et al., 2018). Nesse trabalho, as

plantas do tratamento com a maior temperatura foliar (mancozebe) apresentaram o menor conteúdo de clorofila **b**.

As trocas gasosas, medidas através da condutância estomática, foram semelhantes dentre todos os tratamentos. Para as plantas submetidas à déficit hídrico se esperava uma diminuição na condutância estomática, que representa as trocas gasosas, porque uma das principais respostas da planta à falta da água é o fechamento de estômatos para evitar que a água presente em suas células seja perdida ao ambiente.

O conteúdo relativo de água das plantas de soja foi maior para as plantas irrigadas em comparação àquelas sob restrição hídrica. Sete dias de restrição de água foram responsáveis por reduzir o conteúdo de água das plantas em 45% (Figura 2B). É provável que a planta trabalhe em um limiar, ou seja, ela tem menos água disponível no solo, mas continua com o seu metabolismo consumindo a água e, assim, reduz o conteúdo interno de água; e somente a partir de um dado momento crítico considerar outras alterações, como as trocas gasosas e temperatura foliar.

Schneider et al. (2020) encontraram diferenças em potencial de água da folha, conteúdo relativo de água, temperatura foliar e condutância estomática, em plantas de soja irrigadas e submetidas há oito dias de déficit hídrico, com potencial de água do solo de -0,96 MPa, indicando que talvez essas plantas já pudessem ter chegado em uma condição mais crítica, sendo necessário ativar mecanismos de defesa.

Nesse trabalho também não foram observadas diferenças entre o conteúdo relativo de água de plantas controle e sob aplicação de fungicida, irrigadas ou em déficit, embora a literatura mostre que pode haver uma maior eficiência no uso da água com a utilização de fungicidas em plantas sob déficit hídrico (GIULIANI et al., 2018).

3.4.1 Pigmentos fotossintéticos

O teor de clorofila **a**, **b** e total não se diferenciaram entre os tratamentos analisados. A clorofila total apresentou a mesma resposta da clorofila **a**, visto que esta é

a de maior proporção na clorofila total. As clorofilas *a* e *b* absorvem comprimentos de onda diferentes (TAIZ et al., 2017). Em um estudo, Dias et al. (2014) observaram a redução de 25% na clorofila *b*, em plantas de alface expostas ao mancozebe. Neste trabalho, os autores verificaram maior impacto na clorofila das folhas jovens, visto que nessas o aparelho fotossintético é menos estável, em comparação com as folhas mais expandidas.

Considerando que as clorofilas são pigmentos verdes especializados na absorção da luz (TAIZ et al., 2017), a diminuição da clorofila *b* pode ser decorrente da menor absorção de fótons diminuindo assim a absorção de luz pelas plantas. Plantas de soja sob déficit hídrico, no estágio vegetativo também diminuíram o conteúdo de clorofila *b* quando submetidas a aplicação de epoxiconazole e piraclostrobina a 0,15% (KANUNGO et al., 2021).

Outros trabalhos evidenciaram aumentos no teor de clorofila em plantas de soja submetidas à aplicação de fungicidas (ZAMBIAZZI et al., 2018), e plantas de mandioca tratadas com piraclostrobina e azoxistrobina (JULIÃO et al., 2020). As estrobilurinas incrementam a taxa fotossintética e a atividade da enzima nitrato redutase (FAGAN et al., 2010), e consequentemente, o metabolismo do nitrogênio, o que está correlacionado com os pigmentos fotossintéticos, e pode explicar os aumentos nos teores de clorofila.

3.4.2 Fluorescência total da clorofila e rendimento quântico do fotossistema II

A fluorescência total da clorofila e o rendimento quântico do fotossistema II foram iguais para todos os tratamentos avaliados. A fluorescência da clorofila é uma ferramenta simples usada como indicativo de estresse (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; BAKER, 2008).

O rendimento quântico do fotossistema II relaciona a fluorescência variável com a fluorescência máxima, sendo, portanto, indicativo da eficiência dos centros do fotossistema II (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009). De acordo com esses autores é um

indicador do potencial fotossintético da planta, e pode indicar efeito fotoinibitório em caso de exposição a estresses. Os valores de rendimento quântico do fotossistema II (FSII) foram superiores a 0,8 mmol CO₂ mmol/fótons, o que indica que não ocorreram danos aos centros de reação associados aos fotossistemas (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; SUASSUNA et al., 2011; RIOS et al., 2017).

Assim como observado nesse estudo, em um trabalho com plantas de soja expostas à aplicação de um fungicida sistêmico (epoxiconazole + piraclostrobina), também não foram identificadas variações na fluorescência e no rendimento quântico, em comparação às plantas controle (RIOS et al., 2017). Com relação ao estresse por falta de água, também foram encontrados dados da literatura corroborando com esse estudo, em que plantas bem irrigadas e sob déficit hídrico tiveram semelhantes valores de fluorescência da clorofila, e rendimento quântico do FSII (ZHANG et al., 2016).

Considerando que as plantas estavam com pouca água disponível para a realização da fotossíntese (baixo conteúdo relativo de água), haveria uma tendência de que plantas estressadas apresentassem menor rendimento quântico do FSII e maior fluorescência. Com pouca água disponível, normalmente há uma redução na realização da fotossíntese, pois a planta fecha estômatos (embora não tenha sido observado redução nas trocas gasosas), podendo resultar em excesso de energia luminosa e excesso de energia de excitação.

Nesse caso, o que pode ter acontecido foi que, de alguma forma, as plantas encontraram maneiras para proteger seu fotossistema. Assim, é possível que plantas sob déficit hídrico tenham protegido seu aparato fotossintético, com os pigmentos acessórios (carotenoides), a partir da dissipação de energia, o quenching não fotoquímico, ou quenching da fluorescência da clorofila (TAIZ et al., 2017).

Além de perda de energia de luz absorvida em forma de fluorescência da clorofila, há uma segunda alternativa, que seria a perda de energia em forma de calor (BAKER et al., 2008). Percebe-se que é há um sentido para a perda em forma de calor, pois não foram observadas diferenças de temperatura das plantas irrigadas e sob déficit,

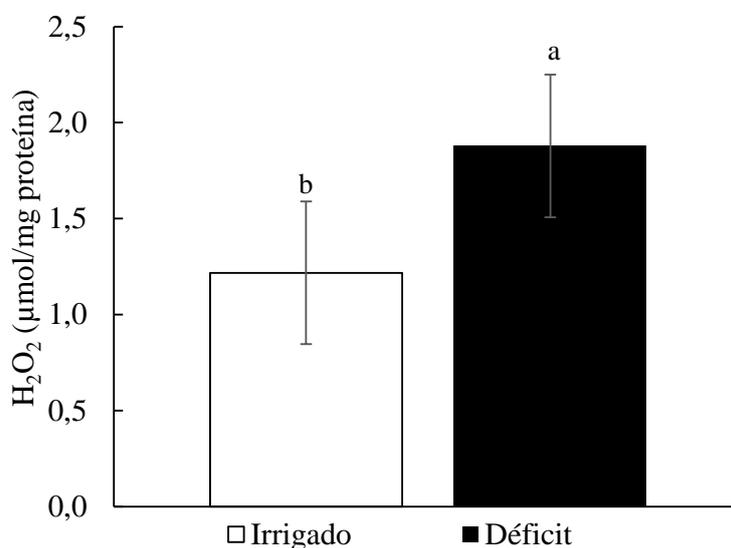
o que é normalmente esperado, visto que um menor conteúdo de água resulta em menor arrefecimento das plantas.

Ainda, hipotetiza-se que a planta continuou realizando fotossíntese, uma vez que as trocas gasosas não diferiram entre plantas irrigadas e sob déficit e considerando que o rendimento quântico do fotossistema II também permaneceu inalterado, mesmo nas plantas estressadas. Assim, a energia absorvida da luz seguiu para o fotossistema II, sem ser perdida na forma de calor ou de fluorescência da clorofila.

3.4.3 Espécies reativas de oxigênio

As duas EROs avaliadas tiveram respostas diferentes, sendo que a produção de peróxido de hidrogênio foi maior nas plantas de soja sob déficit hídrico (Figura 3). A concentração de H_2O_2 nos tecidos das folhas das plantas do tratamento de restrição de água apresentou um aumento de $0,27 \mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína. Já a concentração de superóxido não variou entre os tratamentos estudados.

Figura 3 - Peróxido de hidrogênio em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



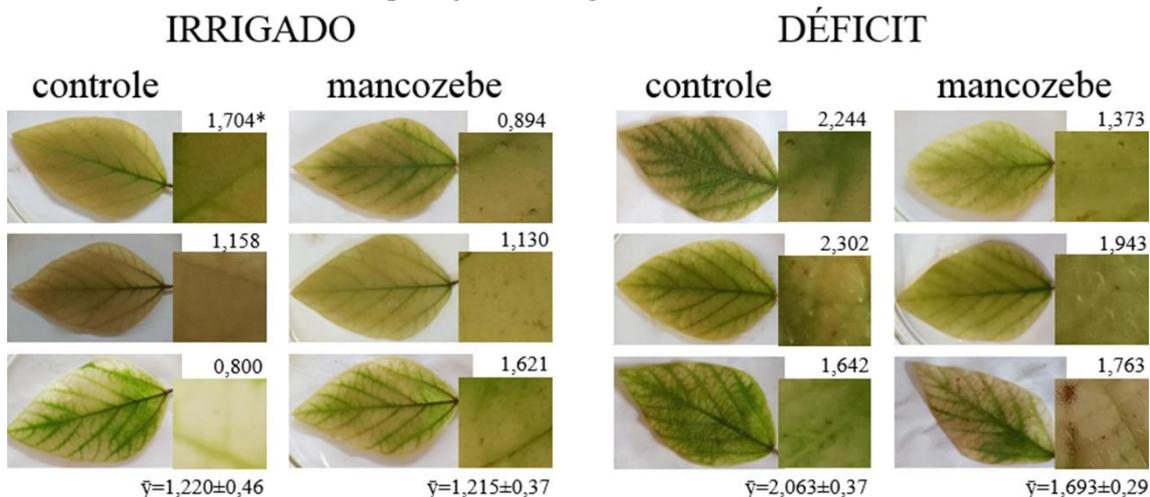
CV= 14,51%

CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

As imagens dos folíolos da análise de detecção *in situ* do H₂O₂ confirmam os dados avaliados quantitativamente (Figura 4). Há uma tendência para redução da produção de H₂O₂, visualizada pelas pontuações de coloração marrom-avermelhado, em plantas sob déficit hídrico que receberam a aplicação do mancozebe, em comparação às plantas do controle.

Figura 4 - Detecção *in situ* do peróxido de hidrogênio em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



Nota: *valores de peróxido de hidrogênio quantificados pela metodologia de Loreto; Velikova (2001), e expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína. \bar{y} representa a média dentro de cada tratamento e \pm representa o desvio padrão. Dados não normalizados.

Observou-se um padrão diferenciado para a produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio dentro das células e acredita-se que seja possível que as plantas não se diferenciaram com relação à produção de O₂⁻ porque essa espécie pode ter tido um pico de produção durante o período de déficit, a qual já não apresentava mais respostas no momento da avaliação. Isso está embasado em um trabalho anterior, que avaliou quatro disponibilidades de água, sendo que o superóxido respondeu nas plantas com déficit hídrico intermediário (seis dias de restrição hídrica), e não apresentou resposta significativa no nível mais severo de estresse (SCHNEIDER et al., 2020).

Acredita-se que essa seja uma resposta da planta frente ao estresse, já que as EROs têm um papel duplo nas células. Então, antes de se tornarem citotóxicas, podem atuar como sinalizadoras de estresse, indicando à planta que é momento de ativar mecanismos de defesa. Uma vez ativado o metabolismo de defesa das plantas, esse atua

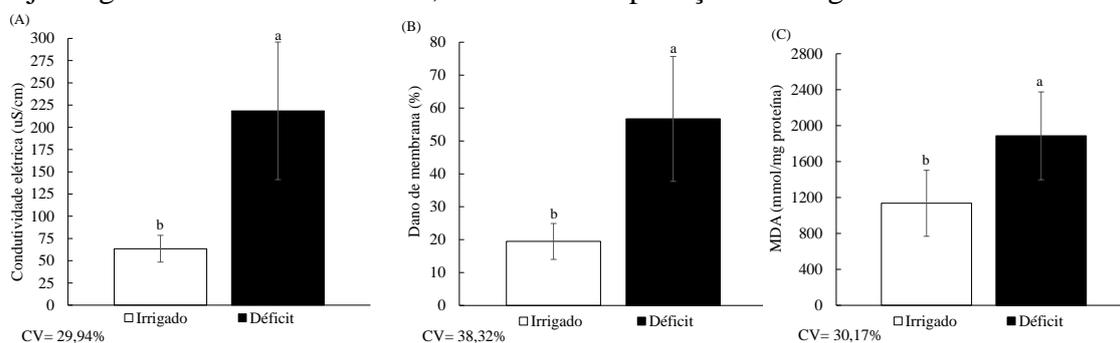
eliminando o excesso de EROs e mantendo-as em níveis basais, em equilíbrio com os mecanismos antioxidantes (MITTLER, 2017; HASANUZZAMAN et al., 2020).

Além disso, se observada a lógica da produção das EROs (Anexo II), percebe-se que o $O_2^{\cdot-}$ pode ter sido produzido primeiro, no transporte de elétrons, na cadeia de transporte de elétrons (GILL; TUTEJA, 2010). Essa espécie é formada pela redução do oxigênio, ou seja, elétrons livres se ligam ao oxigênio dando origem a essa forma reativa. O H_2O_2 por sua vez pode ser produzido depois, a partir da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, por meio de várias reações (GILL; TUTEJA, 2010). O H_2O_2 é uma molécula com maior tempo de vida, maior estabilidade e de maior permeabilidade nas membranas, sendo transportada, inclusive, por aquaporinas específicas, enquanto o superóxido se caracteriza por ter maior reatividade, exercer efeitos tóxicos e danificar proteínas (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

3.4.4 Danos oxidativos

As três metodologias diferentes utilizadas para quantificar os danos causados pelo estresse oxidativo das plantas indicaram um mesmo padrão de resultado. A condutividade elétrica, o dano de membrana e a peroxidação lipídica foram maiores em plantas sob déficit hídrico (Figura 5). A aplicação do mancozebe não causou alterações em danos oxidativos.

Figura 5 - Condutividade elétrica, dano de membrana e conteúdo de MDA de plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

A análise de condutividade elétrica é uma variação do método de dano de membrana, que é cientificamente aceito, e muito usado na avaliação de estresse. A variação do método é constituída por um kit para medição da condutividade elétrica, voltado para produtores, e que vem apresentando resultados satisfatórios nos experimentos que vem sendo testados.

Os danos oxidativos observados estão provavelmente relacionados com o aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies quando em excesso nas células, causam danos de peroxidação dos lipídios das membranas, e oxidação de proteínas, refletindo assim nos danos oxidativos (MILLER et al., 2010). A organela considerada mais sensível ao estresse hídrico é a membrana celular (DONG et al., 2019). A literatura indica que o déficit hídrico leva à danos de membrana e aumentos no MDA (RUPPENTHAL et al., 2016; GULER; PEHLIVAN, 2016; XING et al., 2016; TANG et al., 2017; DUC; CSINTALAN; POSTA, 2018; DONG et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2020).

A integridade estrutural da membrana está relacionada com os níveis de H_2O_2 nas células (SHAHID et al., 2018), sendo que as membranas são muitas vezes uma das fontes primárias atingidas pelos estresses abióticos (FAROOQ et al., 2009). Nesse trabalho observou-se que o estresse induzido por déficit hídrico aumentou a produção de H_2O_2 e o dano oxidativo nas membranas.

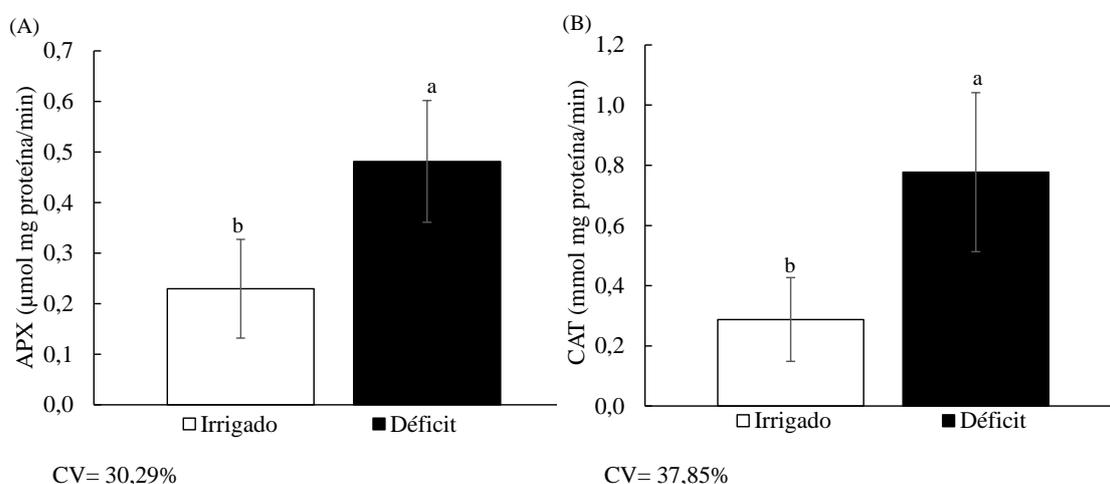
3.4.5 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas ascorbato peroxidase e catalase diferiu entre as plantas com diferentes manejos de irrigação. A exposição das plantas a condição de déficit hídrico induziu ao aumento na atividade dessas enzimas antioxidantes de defesa (Figura 6).

A atividade da superóxido dismutase não apresentou variações entre os tratamentos avaliados. A atividade média da SOD quantificada nesse experimento foi de 77 unidade SOD/mg proteína.

É interessante fazer uma relação entre a concentração das espécies reativas de oxigênio e a atividade das enzimas, visto que estes antioxidantes atuam na neutralização do excesso destas espécies e possíveis danos que podem causar, quando há um desequilíbrio no metabolismo. Assim, o $O_2^{\cdot-}$ não diferiu entre os tratamentos controle e mancozebe, e nem entre plantas irrigadas e sob estresse hídrico, e da mesma forma, a principal enzima que atua na remoção dessa ERO, a SOD (WANG et al., 2018), também não apresentou nenhuma diferença entre os tratamentos avaliados.

Figura 6 - Atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase e catalase em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

Da mesma forma observou-se a atividade da catalase e da ascorbato peroxidase, que atuam principalmente na eliminação e/ou neutralização do peróxido de hidrogênio (Anexo II). O H_2O_2 teve sua produção aumentada, e assim as enzimas antioxidantes APX e CAT aumentaram sua atividade, para tentar controlar a concentração dessa espécie nas células.

É importante considerar ainda, o fato de que a SOD é considerada a enzima da linha de frente de defesa das plantas (GILL; TUTEJA, 2010). Assim, pode ser que ela tenha sido ativada primeiramente e que no momento da avaliação já tinha diminuído sua atividade, em detrimento da maior atividade das outras, pois a planta tem seus processos

acontecendo durante todo o tempo. A SOD age dismutando o $O_2^{\bullet-}$, o qual é catalisado em H_2O_2 e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010; GUO et al., 2018) e isso refletiu no aumento da atividade das outras enzimas específicas para essa ERO (APX e CAT), que era a espécie reativa encontrada em maior quantidade nas células naquele momento.

Outros trabalhos realizados avaliando o impacto do estresse na atividade de enzimas antioxidantes também mostraram aumento da APX (GULER; PEHLIVAN, 2016; MOLOI; MWENYE; van der MERWE, 2016; WANG et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2020) e da CAT (GULER; PEHLIVAN, 2016; XING et al., 2016; TANG et al., 2017; XU et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2020).

De acordo com Dong et al. (2019), é necessário que a planta ative todo seu sistema antioxidante para remover o excesso de EROs, e prevenir danos, e não apenas atuar com uma enzima antioxidante isolada. O estímulo do metabolismo antioxidante é uma das estratégias para minimizar os danos causados pelo estresse de déficit hídrico (TEIXEIRA et al., 2020). De acordo com esses autores, outras opções para reduzir os efeitos incluem o aumento do sistema radicial, possibilitando assim explorar um maior volume de solo, ou ainda melhorar a condição do solo, alterando sua capacidade de retenção de água.

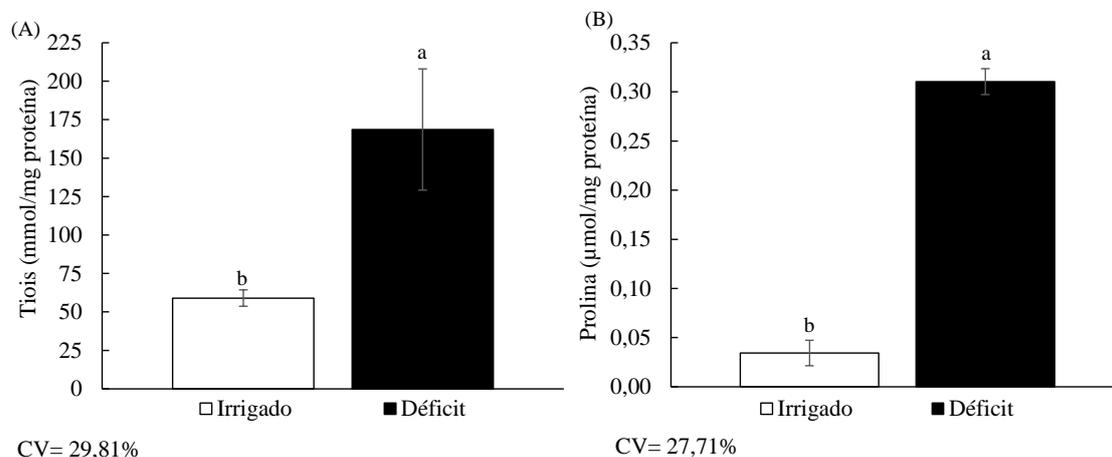
3.4.6 Compostos antioxidantes não-enzimáticos

Com relação aos compostos antioxidantes não enzimáticos, o conteúdo de tiois não protéicos foi maior nas plantas de soja sob déficit hídrico, mas não diferiu para as plantas tratadas e não com mancozebe (Figura 7A).

Tiois não protéicos são uma forma indireta do composto antioxidante glutaciona, a qual atua neutralizando principalmente as EROs superóxido e radical hidroxila (NOCTOR; FOYER, 1998). Isso indica que plantas de soja, quando estressadas por falta de água ativam compostos de defesa, que atuam auxiliando as plantas a enfrentarem esse período. A glutaciona representa um importante papel nessa proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico (LABUDDA; AZAM, 2014). A

literatura tem trabalhos mostrando o aumento da glutatona em plantas de soja sob déficit hídrico (WANG et al., 2016; XING et al., 2016).

Figura 7 - Conteúdo de tiois não protéicos e prolina em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

A prolina diferiu apenas para o fator água, sendo a maior média encontrada para plantas sob déficit hídrico (Figura 7B). Plantas de soja expostas a uma condição de déficit hídrico tiveram seu conteúdo de prolina aumentado em mais de 90% em comparação com as plantas irrigadas, não tendo diferido com a aplicação do xenobiótico.

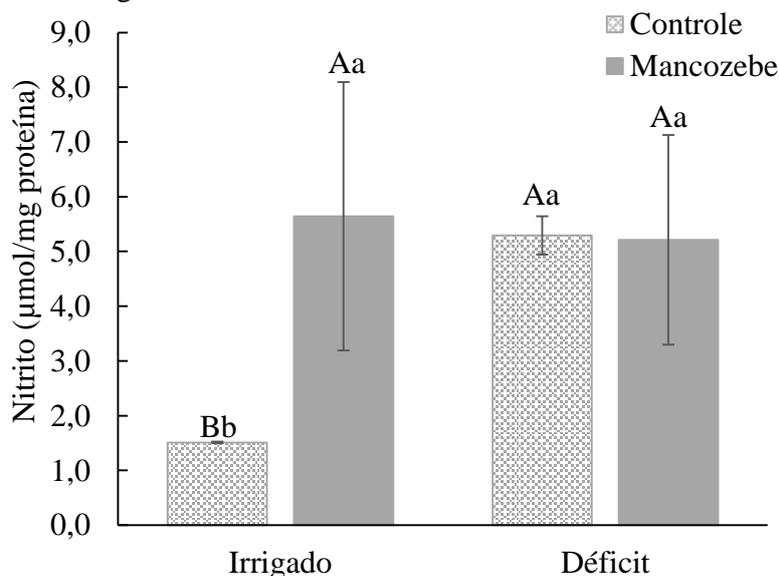
A prolina é considerada um soluto compatível, que se acumula nas células em condições de déficit hídrico, como foi visto nesse trabalho e corroborando com outros estudos (DEVI; GIRIDHAR, 2015; KHAN et al., 2015). Assim como a ativação de antioxidantes, a síntese de prolina é um processo metabólico ativo que demanda energia da planta e utiliza grande quantidade de carbono (TAIZ et al., 2017), portanto fornecer produtos exógenos que tenham antioxidantes ou compostos precursores dessas substâncias poderá expandir o sistema de defesa da planta, deixando-a menos vulnerável, e ainda contribuir para redução do gasto energético, que poderá ser destinado para reprodução e produtividade.

Além do papel do ajuste osmótico proporcionado, a prolina tem uma função osmoprotetora, pois protege as células de subprodutos tóxicos produzidos sob estresse, e assim fornecem carbono e nitrogênio para a célula, após o término do período de estresse, e atua na regulação do pH citoplasmático (AGGARWAL et al., 2011; TAIZ et al., 2017). Esse osmólito pode atuar com base em diferentes mecanismos, tanto pelo estímulo da fisiologia da planta como pela melhoria do sistema antioxidante, detoxificando EROs, se acumuladas, e corrigindo o potencial redox das células (MEENA et al., 2019).

O conteúdo de nitrito estima indiretamente o conteúdo de óxido nítrico das plantas. Essa foi a única variável resposta a apresentar interação significativa entre os manejos de água e do mancozebe, sendo que a menor concentração de nitrito é observada nas plantas irrigadas sem aplicação de mancozebe (Figura 8). Dentro do fator controle (sem mancozebe), o maior conteúdo de óxido nítrico foi para plantas sob déficit hídrico, as quais apresentaram 1,074 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína, em comparação com as plantas irrigadas. Com relação ao nível irrigado, as plantas submetidas à aplicação tiveram o maior conteúdo de óxido nítrico, 1,11 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína a mais em comparação às plantas do controle.

O óxido nítrico parece ter uma maior sensibilidade às mudanças ambientais, visto que sua concentração nas células foi modificada pela aplicação de mancozebe nas plantas irrigadas, nas plantas sob déficit e nas plantas sob déficit hídrico sem o xenobiótico. Essas alterações devem estar relacionadas com o papel do óxido nítrico na defesa contra danos oxidativos, e neutralização das EROs (PARANKUSAM et al., 2017; CHENG et al., 2002).

Figura 8 - Conteúdo de nitrito em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



CV= 15,19%

CV: coeficiente de variação.

Nota: As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

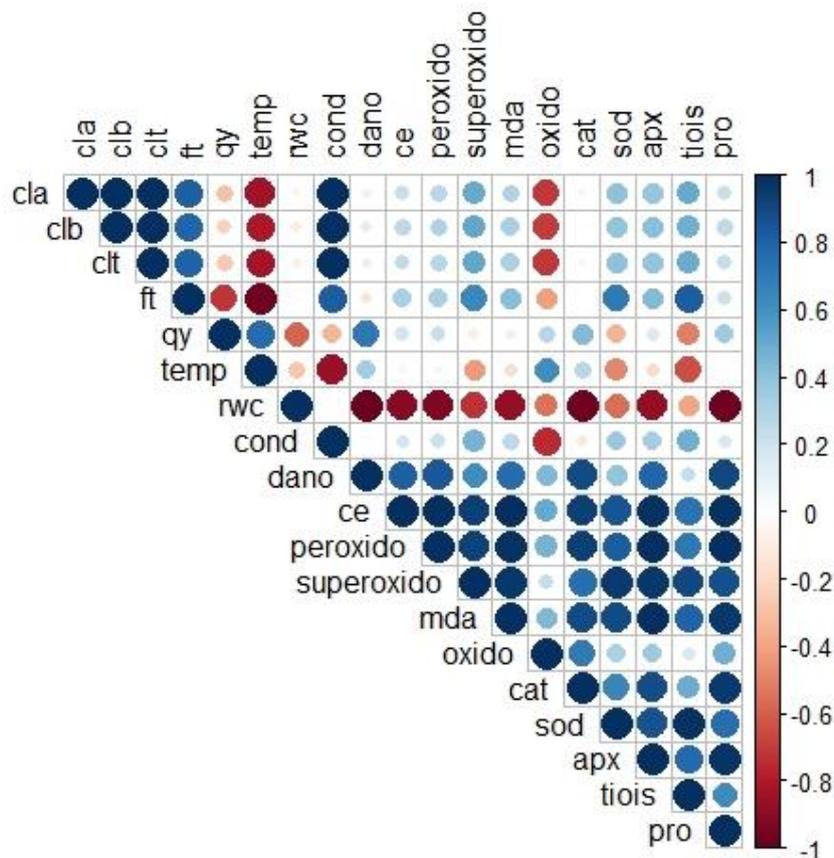
3.4.7 Correlação

Todas as variáveis foram correlacionadas entre si (Figura 9), e foi possível observar correlação forte e positiva entre a enzima catalase com dano de membranas, condutividade elétrica, peroxidação lipídica, concentração de H_2O_2 e atividade da enzima ascorbato peroxidase. Também com relação ao metabolismo antioxidante, a enzima SOD correlacionou-se forte e positivamente com os antioxidantes (tiois e APX), com EROs ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) e com danos oxidativos (peroxidação lipídica e condutividade elétrica).

A catalase atua na eliminação do H_2O_2 , através da dismutação dessa ERO em água e oxigênio (GARG; MANCHANDA, 2009). Assim, evita-se possíveis danos que o peróxido poderia causar numa situação de acúmulo pela ocorrência de algum estresse. Assim, a neutralização desse peróxido de hidrogênio acumulado nas células, reduz a ocorrência de danos celulares, peroxidação de lipídios, e danos oxidativos em membranas.

Além das enzimas antioxidantes, as correlações observadas com os compostos antioxidantes não enzimáticos, mostram essa relação com o aumento da sua produção numa condição de estresse. Aumento na concentração de glutathiona, representada pelos tiois decorre do fato de ser a principal defesa intracelular contra os danos oxidativos induzidos pelas EROs (GILL; TUTEJA, 2010). De acordo com esses autores, a síntese de glutathiona é dependente de ATP, ou seja, há um gasto energético envolvido na produção desse composto. Numa situação de estresse, para evitar que a planta demande energia que poderia ser destinada a seu crescimento, e utilize para indução de defesas, o uso de bioestimulantes é uma opção.

Figura 9 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis avaliadas em plantas de soja irrigadas e em déficit hídrico, com e sem a aplicação do fungicida mancozebe.



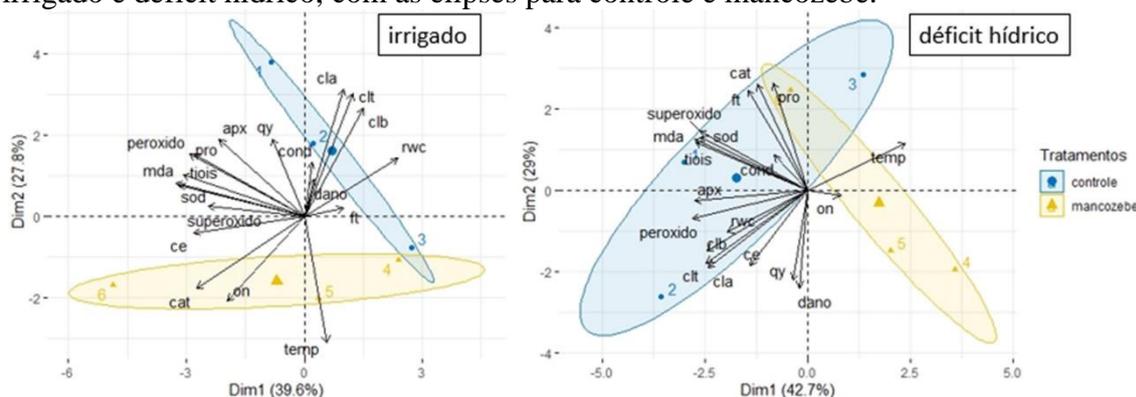
Abreviações: cla – clorofila *a*, clb – clorofila *b*, clt – clorofila total, temp – temperatura da folha, cond – condutância estomática, rwc – conteúdo relativo de água, ft – fluorescência total, qy – rendimento quântico do FSII, dano – dano de membrana, ce – condutividade elétrica, mda – peroxidação lipídica, peroxido – peróxido de hidrogênio, superoxido – superóxido, apx – ascorbato peroxidase, cat – catalase, sod – superóxido dismutase, tiois – tiois não proteicos, on – óxido nítrico, pro – prolina.

Correlações fortes e positivas também foram encontradas entre a condutância estomática e o conteúdo de clorofila da planta (clorofila *a*, *b* e total), indicando que uma maior capacidade de trocas gasosas com o ambiente, aumenta a capacidade fotossintética da planta.

3.4.8 Análise multivariada de componentes principais

Para o tratamento irrigado, a variância total explicada pelos dois primeiros componentes principais foi de 67,4%, sendo 39,6% explicada pelo CP1 e 27,8% pelo CP2 (Figura 10). As variáveis mais responsáveis pelas variações entre os tratamentos foram clorofila *a* e total, temperatura da folha, peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂, atividade de CAT e SOD e conteúdo de prolina e tiois (Apêndice IV).

Figura 10 - Biplot com a projeção das variáveis no plano fatorial para os tratamentos irrigado e déficit hídrico, com as elipses para controle e mancozebe.



Abreviações: cla – clorofila *a*, clb – clorofila *b*, clt – clorofila total, temp – temperatura da folha, cond – condutância estomática, rwc – conteúdo relativo de água, ft – fluorescência total, qy – rendimento quântico do FSII, dano – dano de membrana, ce – condutividade elétrica, mda – peroxidação lipídica, peroxido – peróxido de hidrogênio, superóxido – superóxido, apx – ascorbato peroxidase, cat – catalase, sod – superóxido dismutase, tiois – tiois não proteicos, on – óxido nítrico, pro – prolina.

A variância total explicada para o déficit hídrico foi de 42,7% para o CP1, e 29% para o CP2, totalizando 71,7%, explicada principalmente pelas variáveis: clorofila *a* e total, EROs (H₂O₂ e O₂^{•-}), peroxidação lipídica e antioxidantes (atividade da APX, CAT e SOD, conteúdo de tiois e prolina).

A análise separou os tratamentos do controle e da aplicação de mancozebe em duas elipses, sendo que as variáveis mais correlacionadas com o mancozebe foram a temperatura da folha, a atividade da enzima catalase, o conteúdo de óxido nítrico, e prolina (apenas para o déficit hídrico).

3.5 Conclusões

A aplicação de mancozebe afeta a temperatura foliar e a concentração de óxido nítrico de plantas de soja. É responsável por aumentar a temperatura foliar e aumentar a produção de óxido nítrico em plantas irrigadas. Não foram observados efeitos deletérios do mancozebe como xenobiótico, quando aplicado na dose recomendada para a cultura da soja, mesmo em condições de déficit hídrico.

As plantas apresentam efeitos deletérios causados pelo déficit hídrico, principalmente com relação ao estresse oxidativo induzido por esse estresse abiótico. São evidentes as alterações no metabolismo oxidativo e antioxidante, embora poucos reflexos são confirmados pelos aspectos fisiológicos.

A combinação de dois estresses, nesse caso déficit hídrico e mancozebe, não resulta na maximização de efeitos negativos. Muitas vezes a resposta da planta para estresses simultâneos pode ser incrementada, mas a planta reage a cada nova situação de diferentes estresses combinados de forma única.

Isso indica que outras estratégias devem ser utilizadas para mitigação de estresse por déficit hídrico, em plantas de soja. As respostas do mancozebe associado a outros estresses pode ser melhor explorada com a execução de mais trabalhos, alterando o momento da aplicação, antes do estresse, ou após reidratação das plantas e, ainda, com as coletas em diferentes tempos após a aplicação, visto que isso poderá interferir em relação aos tipos de resposta das variáveis bioquímicas e também no que diz respeito às variáveis fisiológicas.

4 CAPÍTULO II

Produção de prolina e óxido nítrico em plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água, aplicação de fungicida e bioestimulante

4.1 Resumo

Várias alterações no metabolismo das plantas são desencadeadas frente à sua exposição a fatores de estresse. O óxido nítrico é um composto gasoso que tem destaque pela sua atuação multifuncional, devido ao seu importante papel na defesa contra estresse e danos oxidativos, mensageiro secundário e sinalizador de estresses. Outro componente que vem chamando a atenção em estudos de déficit hídrico é a prolina, que além de antioxidante, é um osmorregulador e um soluto osmólito, considerado em estudos de tolerância à estresses. Desse modo, esse estudo teve como objetivo verificar se a concentração de óxido nítrico e prolina aumentam em uma situação de déficit hídrico e aplicação de xenobióticos, além de conhecer a interação da aplicação de bioestimulante com esses compostos. Dois experimentos foram conduzidos no ano de 2018, na Universidade de Passo Fundo, no Laboratório de Fisiologia Vegetal, em câmara de crescimento. Os experimentos foram em esquema bifatorial, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram o potencial da água do solo (-0,96; -0,38; -0,07 e -0,02 MPa, para 2018-I, e -3,09; -1,38; -0,69 e -0,14 MPa, para 2018-II) e os xenobióticos (controle, fungicida, bioestimulante e fungicida e bioestimulante). Após oito dias de restrição de água foram realizadas as aplicações de xenobióticos. Decorridas 48 horas da aplicação dos xenobióticos foram realizadas as coletas dos trifólios para as análises enzimáticas. A partir desse extrato enzimático foi possível a determinação da proteína bruta, do óxido nítrico (indiretamente pela quantificação de nitrito) e da prolina. Produção aumentada de óxido nítrico e prolina foi observada em plantas de soja submetidas a potenciais da água do solo iguais ou menores que -1,38 MPa. Isso pode indicar um limite inferior para início dos efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo desencadeado pelo estresse combinado de déficit hídrico e aplicação de xenobióticos. No potencial da água do solo de -3,09 MPa as plantas tiveram a maior concentração de prolina quando tratadas com bioestimulante, indicando que esse pode ser utilizado como um indutor de defesas contra estresses abióticos.

Palavras-chave: 1. *Glycine max*. 2. Estresse. 3. Osmorregulador. 4. Sinalização. 5. Antioxidante.

4.2 Introdução

Em condições de campo as plantas podem enfrentar condições desfavoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Esses fatores estressantes podem ser bióticos, como pragas ou doenças, ou fatores abióticos, como temperatura, água, poluentes, xenobióticos e metais pesados. Os principais estressores que prejudicam a produção de

soja são o déficit hídrico (MA et al., 2017) e a temperatura elevada, que aparecem em conjunto com alta frequência (JUMRANI; BHATIA, 2018).

Outro fator estressante frequente na cultura da soja é a aplicação de xenobióticos, como herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros compostos químicos que não estão na composição da planta e, portanto, são estranhos às elas. Um manejo comum em soja é a aplicação de fungicidas com intervalos de aproximadamente 15 dias, ação que pode culminar com um período de déficit hídrico. Aplicações sequenciais também contribuem para uma situação de fitotoxidez, visto que as plantas demoram um tempo para assimilar essas substâncias às quais foram expostas.

Os danos causados por fatores estressantes isolados podem ser potencializados em uma situação de estresses combinados, que podem sobrecarregar o metabolismo da planta devido a um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, condição que leva ao estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs), quando acumuladas em maior concentração nas células vegetais têm o potencial de causar danos oxidativos, como peroxidação lipídica, danos em membranas celulares, proteínas estruturais e até mesmo originando a morte celular (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017).

Para prevenir esses danos oxidativos, as plantas possuem um sistema de defesa que inclui antioxidantes enzimáticos (ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase) e antioxidantes não enzimáticos (óxido nítrico, prolina e tiois não proteicos), os quais atuam na neutralização das EROs produzidas e de xenobióticos presentes no tecido vegetal (CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016b; CHAKI; BEGARÁ-MORALES; BARROSO, 2020).

Um antioxidante comum é a prolina, que também atua como um osmorregulador e um soluto osmólito (YANCEY, 2005; KIDO et al., 2013; REDDY et al., 2015; SINGH et al., 2015). Assim, a prolina regula a quantidade de água nas plantas para manter a pressão de turgescência (DONG et al., 2019). Ou seja, em situações de estresse há ocorrência de acúmulo de prolina nos tecidos do vegetal, o que também pode

significar a redução na síntese de proteínas por parte o organismo (SHARMA et al., 2012).

O óxido nítrico (ON) é um composto gasoso com importante papel na defesa contra os danos oxidativos e na desintoxicação de EROs (PARANKUSAM et al., 2017). O ON é um mensageiro de processos fisiológicos, atuando na sinalização das respostas da planta aos estresses (GROB; DURNER; GAUPELS, 2013; HE et al., 2019).

Ambos os compostos, óxido nítrico e a prolina, são considerados mecanismos vegetais de tolerância ao estresse (CECHIN et al., 2015; HASANUZZAMAN et al., 2021 b; HE et al., 2019). Deste modo, este estudo teve como objetivo verificar se a concentração de óxido nítrico e prolina aumentam em uma situação de déficit hídrico e aplicação de xenobióticos, além de compreender a interação da aplicação de bioestimulante com esses compostos.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Sujeito da pesquisa e local do experimento

Foram avaliadas folhas de plantas de soja da cultivar DM 5958 IPRO que possui ciclo super-precoce (grupo de maturação 5.8), flor de coloração roxa, hábito de crescimento indeterminado e porte médio. O experimento foi conduzido em 2018 no Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Universidade de Passo Fundo, RS.

Essas plantas se desenvolveram em ambiente controlado, numa câmara de crescimento, sendo mantidas 14 horas de iluminação artificial, com a utilização de lâmpadas fluorescentes e LED intercaladas, de cor branca (temperatura de cor 6400K), e fluxo luminoso de 2.790 lumens. A densidade de fluxo de fótons foi medida com o ceptômetro (ACCUPAR LP-80, DECAGON), sendo obtida a densidade de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. A temperatura do ar e a umidade relativa do ar foram medidas com o datalogger de umidade e temperatura digital (modelo HT-70, Instrutherm), sendo observados valores médios de 64,8% e 25,1 °C. O valor máximo encontrado foi de 27,2

°C para temperatura, e 79,4% para umidade. Os valores mínimos foram 37,5% e 23,0 °C.

4.3.2 Delineamento experimental e tratamentos

Dois experimentos foram conduzidos em sequência, sendo 2018-I e 2018-II, nas mesmas condições, tendo variado apenas a época do ano. Isso acarretou em diferenças na umidade do ar, e conseqüentemente variações na umidade de água do solo. Assim, mesmas quantidades de água fornecidas e mesmo período sem irrigação resultaram em potenciais da água do solo diferentes (Figura 1).

Figura 1 - Esquema dos tratamentos de disponibilidade hídrica, umidade volumétrica e potencial da água do solo dos experimentos 2018-I e 2018-II.

	2018-I	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	
	Sem irrigação	✓	✓	✓	✓	
	Umidade m ³ /m ³	0,35	0,27	0,20	0,17	
	Potencial MPa	-0,02	-0,07	-0,38	-0,96	
	2018-II	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	
Sem irrigação	✓	✓	✓	✓		
Umidade m ³ /m ³	0,24	0,18	0,16	0,14		
Potencial MPa	-0,14	-0,69	-1,38	-3,09		

Figura 2 - Informações dos tratamentos xenobióticos utilizados no experimento.

Xenobiótico	Nome comercial	Dose (L/ha)	Composição	
Controle				
Fungicida (F)	Fox®	0,4	Trifloxistrobina, proclonazol e ingredientes inertes	150, 175 e 775 g/L
Bioestimulante (B)	Foltron Plus®	1,0	Nutrientes (N, P, K, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), ácidos húmicos, aminoácidos (folcisteína) e hormônios (giberelinas)	10, 20 e 5% 100, 80, 50, 500, 100, 2 e 500 ppm 7,8 g/L 2.750 e 30 ppm
F + B				

Os tratamentos, delineados em esquema bifatorial, foram potencial da água do solo (2018-I: -0,96; -0,38; -0,07 e -0,02 MPa e 2018-II: -3,09; -1,38; -0,69 e -0,14 MPa) e xenobióticos (controle, fungicida, bioestimulante e fungicida e bioestimulante) (Figura 2).

4.3.3 Procedimentos experimentais

As sementes foram semeadas em vasos plásticos (11 litros) contendo uma mistura de solo e substrato na proporção de 2:1, com adequadas condições para o cultivo (Tabela 1), e densidade de 0,97 g/cm³.

Tabela 1 - Características químicas e físico-hídricas da mistura solo e substrato.

CTC	18,3	cmol _c /dm ³	Ca²⁺	12,1	cmol _c /dm ³	B	0,4	cmol _c /dm ³
MO	4,5	%	Mg²⁺	2,4	cmol _c /dm ³	Cu²⁺	1,4	cmol _c /dm ³
pH em H₂O	6,0	-	K⁺	132	mg/dm ³	Mn²⁺	4,5	cmol _c /dm ³
índice SMP	6,2	-	P	37,1	mg/dm ³	Zn²⁺	4	cmol _c /dm ³
SB	81	%	SO₄²⁻	24,0	cmol _c /dm ³	Pt	0,6	m ³ /m ³

*CTC: capacidade de troca de cátions; MO: matéria orgânica; pH: potencial hidrogeniônico; SB: soma de bases; H₂O: água; Ca²⁺: cálcio; Mg²⁺: magnésio; K⁺: potássio; P: fósforo; SO₄²⁻: íon sulfato (enxofre); B: boro; Cu²⁺: cobre; Mn²⁺: manganês; Zn²⁺: zinco; Pt: porosidade total.

Foram semeadas oito sementes, e após a emergência feito o desbaste, mantendo-se apenas quatro plântulas em cada vaso. Os vasos receberam a mesma quantidade de água durante a condução do experimento, até o estágio V8 (FEHR; CAVINESS, 1977) que representa o desenvolvimento do oitavo nó e da sétima folha trifoliolada completamente desenvolvida. Neste momento a cada dois dias, os vasos de um dos quatro tratamentos de disponibilidade hídrica deixou de receber irrigação (Figura 1).

Após os oito dias de restrição de água foram realizadas as aplicações de xenobióticos. A aplicação foi realizada utilizando um pulverizador costal de pressão constante, pressurizado com CO₂, equipado com uma barra de 1,5 m e três pontas jato plano defletor, modelo TT 11002, espaçadas de 50 cm. O volume de aplicação foi de 150 L ha⁻¹ e pressão de 2 bar.

4.3.4 Coletas e avaliações

Amostras de solo indeformadas foram coletadas, saturadas com água e colocadas sob seis tensões matriciais diferentes, de 0,01; 1;6; 10, 100 e 300 kPa, em funis de placa porosa e câmara de Richards. Amostras de solo indeformadas também foram coletadas e utilizadas para determinações de potenciais matriciais superiores em um psicrômetro (modelo wp4-T Dewpoint Potential Meter (Decagon Device, 2000). Por meio dessas coletas foi estimada a umidade gravimétrica e volumétrica desse solo. Também foi possível o ajuste da curva de retenção de água desse solo, e a partir dessa a estimativa do potencial da água do solo.

Decorridas 48 horas da aplicação dos xenobióticos foram realizadas as coletas dos trifólios para as análises enzimáticas. Esse tempo foi considerado, uma vez que a literatura indica que o tempo de meia-vida metabólica do xenobiótico é de 96 horas (SATCHIVI et al., 2001).

Cada amostra coletada foi composta pelos últimos trifólios (mais jovens) das quatro plantas de cada vaso, sendo a coleta em nitrogênio líquido. Imediatamente foram pesados, e após a coleta macerados em tampão (volume de quatro vezes a massa fresca). Essa mistura foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm, e força G de 250, durante 10 minutos. Apenas o sobrenadante foi pipetado em eppendorfs e armazenado em ultrafreezer a -80°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).

A partir desse extrato enzimático foi possível a determinação da proteína bruta, do óxido nítrico e da prolina. A proteína do extrato enzimático foi determinada pela metodologia de Bradford (1976), sendo adicionados em um tubo 300 μL 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.

4.3.5 Óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico foi estimada indiretamente a partir da metodologia de Bracht; Ishii-Iwamoto (2003), que avalia a quantidade de nitrito nas células. Em tubos Falcon foram adicionados 500 µL de extrato enzimático e 500 µL de TCA a 50%. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 10 min, força G de 250 (Quimis; Q222T). Então foram pipetados 500 µL do sobrenadante, adicionados a 500 µL de reagente de Griess e realizada leitura da absorbância, em cubeta de 1 mL, em comprimento de onda de 540 nm (Spectrum Meter; SP-2000UV). As concentrações de óxido nítrico dos tecidos foliares foram calculados com base na equação gerada por meio da curva com diferentes concentrações de solução de nitrito.

4.3.6 Prolina

A determinação de prolina seguiu o princípio do método original proposto por Bates; Waldren; Teare (1973), porém com uma adaptação bem atual, que propõe um método bem mais rápido, eficiente, e mais ecologicamente correto (SHABNAM et al., 2015). O extrato enzimático previamente preparado foi acidificado com ácido sulfosalicílico, concentração de 3%, sendo uma proporção de 300 µL de extrato, para 300 µL de ácido. Esse novo extrato foi homogeneizado e pipetado o volume de 500 µL para um tubo de ensaio com tampa. Nesse tubo foram adicionados 2 mL de solução ácida de ninhidrina (0,0625 g de ninhidrina em 15 mL de ácido acético glacial), fechado, homogeneizado e colocado em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos. Após esse período, foi colocado em gelo durante 10 minutos e feita a leitura em cubeta de vidro de 3 mL, em 508 nm, no espectrofotômetro (Cecil, CE 2021 2000 series).

4.3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade de resíduos. Os dados de prolina violaram as pressuposições e tiveram seus dados transformados pelo logaritmo neperiano natural. A análise de variância foi

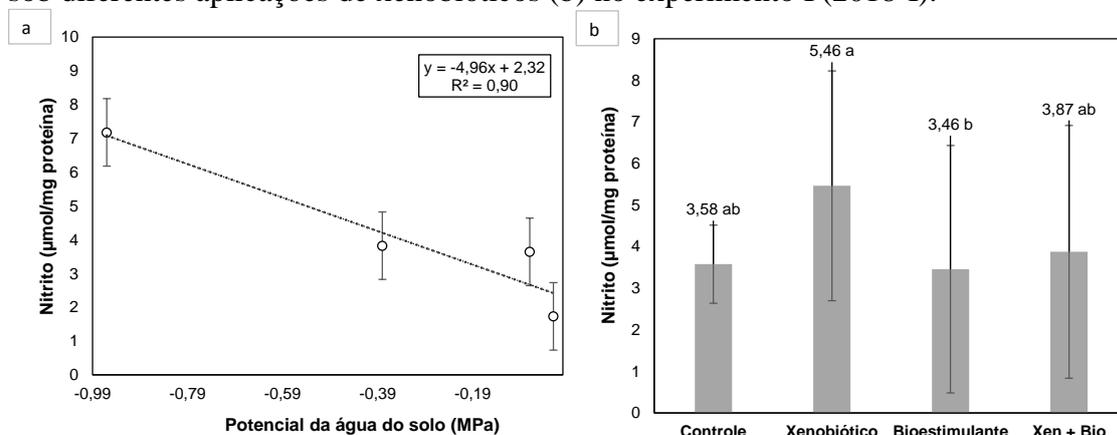
realizada a partir do teste F, sendo as geradas equações de regressão para o fator quantitativo e comparação de médias para o fator qualitativo pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas no software RStudio (R Core Team, 2018) e o pacote utilizado foi o ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018).

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Óxido nítrico

A partir da análise de variância foi possível observar que para o óxido nítrico no experimento I (2018-I) houve significância para os fatores isolados potencial e xenobióticos (Tabela 6 – material suplementar), sendo que uma equação de regressão linear foi gerada para o potencial (Figura 3a) e um teste de comparação de médias Tukey (10% de probabilidade de erro) foi aplicado para o óxido nítrico comparando os tratamentos dos xenobióticos (Figura 3b).

Figura 3 - Óxido nítrico em plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água (a) e sob diferentes aplicações de xenobióticos (b) no experimento I (2018-I).



A concentração de óxido nítrico ajustou-se linearmente em função dos diferentes potenciais da água do solo, sendo que para 8 dias sem irrigação (-0,96 MPa) foi encontrada a maior quantidade de óxido nítrico, de 7 µmol/mg proteína (Figura 3a). O coeficiente de determinação foi de 0,90, o que indica um bom ajuste do modelo linear.

O óxido nítrico está envolvido com a sinalização do estresse, potencializando a defesa antioxidante das plantas e a transcrição de enzimas antioxidantes como APX, CAT e SOD (SANTA-CRUZ et al., 2014). Isso justifica sua maior produção na menor disponibilidade de água (Figura 3a) pois a planta percebeu a necessidade de induzir defesas contra o estresse oxidativo desencadeado pelo estresse por falta de água.

Com relação à aplicação dos xenobióticos, a concentração de óxido nítrico diferiu apenas entre a aplicação de xenobiótico e bioestimulante (Figura 3b). A aplicação de bioestimulante garantiu a redução de 2 $\mu\text{mol/mg}$ proteína de óxido nítrico comparado ao fungicida e diminuição de 1,59 $\mu\text{mol/mg}$ proteína quando aplicado junto com o fungicida.

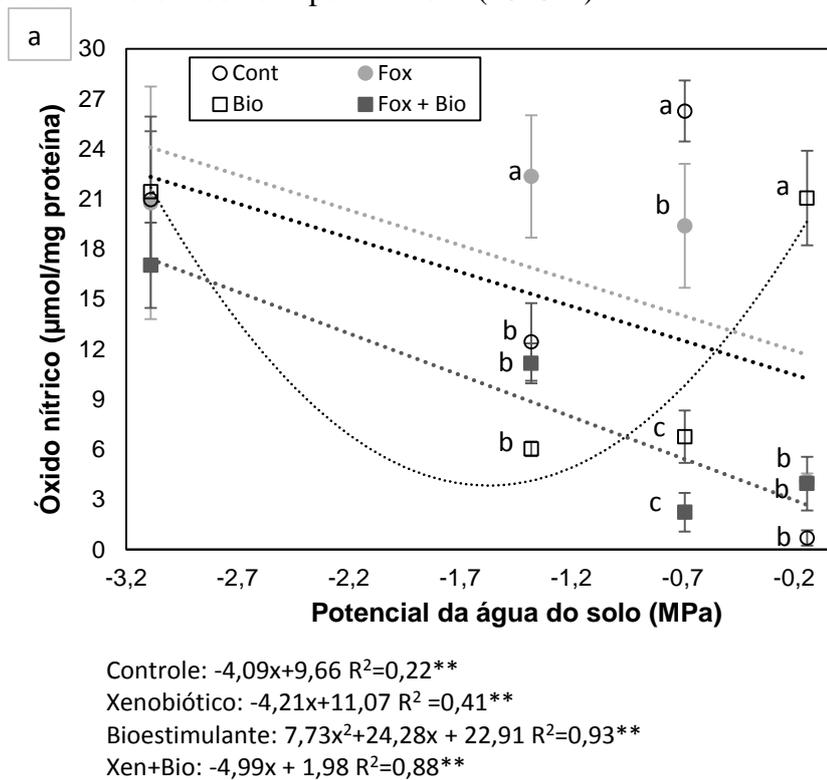
Em relação a isso temos que a aplicação de fungicida estimulou a produção de nitrito, visto que é um fator estressante e pode ser tanto para redução de estresse, como também sinalizador dessa condição. Enquanto que plantas tratadas com bioestimulante tiveram a produção desse composto diminuída, uma vez que esse atua induzindo mecanismos de defesa, que podem não ter sido dessa rota metabólica em específico.

No segundo experimento (2018-II) o nitrito apresentou interação entre os fatores, sendo apresentados os gráficos com o desdobramento da interação (Figura 4). Plantas tratadas com bioestimulante apresentaram resposta quadrática, sendo que a produção de óxido nítrico foi elevada nas plantas irrigadas, diminuiu para o potencial -1,38 MPa e aumentou novamente na menor disponibilidade de água.

No menor potencial da água do solo não foi observada diferença entre os tratamentos com xenobióticos. No potencial -1,38 MPa, plantas tratadas com xenobiótico tiveram a maior produção de óxido nítrico, enquanto que no potencial de -0,7 MPa a produção foi maior para as plantas do controle, seguidas das plantas sob aplicação de fungicida. Nas plantas irrigadas a maior concentração de ON foi observada para as plantas tratadas com o bioestimulante.

O óxido nítrico atua como sinalizador de estresse, e portanto aumentou com a aplicação de xenobiótico no potencial -1,38 MPa (6 dias sem irrigação), condição de estresse combinado, e com estresses mais severos já não é verificada essa resposta. Outra linha é considerar o ON como uma espécie reativa de nitrogênio, causadora de danos, e portanto que foi aumentando com a intensificação do estresse. Ou seja, quanto maior a intensidade de estresse, maior a produção de ON.

Figura 4 - Óxido nítrico de plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água e aplicação de xenobióticos no experimento II (2018-II).

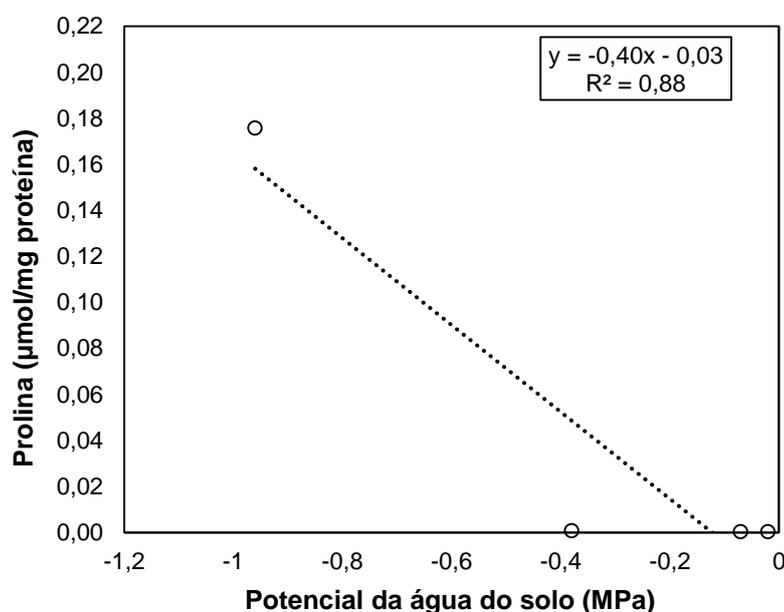


4.4.2 Prolina

A concentração de prolina também foi maior para o potencial da água do solo mais negativo (Figura 5), indicando que quanto mais tempo de falta de água, maior foi a produção de prolina nas plantas. Foi observado um incremento de mais de 85% na concentração de prolina, quando comparada a maior com a menor disponibilidade de água, tendo os dados se ajustado bem ao modelo linear visto que o coeficiente de determinação foi de 0,88.

Já com relação aos xenobióticos não foram observados aumentos no conteúdo de prolina. Embora a aplicação de bioestimulante tenha reduzido a produção de prolina em quase 50%, os tratamentos não diferiram entre si devido aos altos valores de desvio padrão, pela distinção entre os tratamentos. A adição do bioestimulante tem o enfoque de fazer a planta resistir melhor às condições adversas, induzindo o metabolismo antioxidante. Esse fato foi comprovado pelo aumento na atividade da CAT e da glutaciona (medida indiretamente por meio de tiois não proteicos (SCHNEIDER et al., 2020). As defesas constituídas por esses antioxidantes podem ter sido suficientes, e por isso a concentração de prolina pode não ter sido aumentada com o bioestimulante.

Figura 5 - Prolina em plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água e aplicações de xenobióticos no experimento I (2018-I).

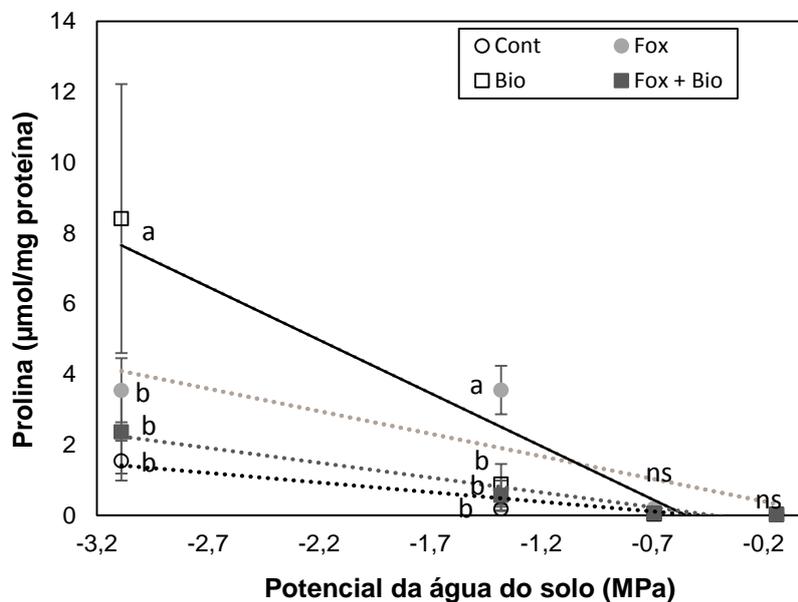


A folcisteína fornecida pelo bioestimulante, poderá por sua vez fornecer cisteína para a glutaciona. Acrescidos à cisteína, a glicina e o glutamato em um tripeptídeo formam a glutaciona, que é hidrossolúvel e que na sua forma reduzida consegue aceitar um elétron, tanto de superóxido, como de peróxido de hidrogênio, neutralizando-os (TAIZ et al., 2017). O bioestimulante induziu o aumento de tiois não proteicos no primeiro experimento (2018-I) (SCHNEIDER et al., 2020). Isso pode indicar também

que em níveis moderados de estresse (potenciais maiores 2018-I) algumas defesas são ativadas, como o caso da glutathiona, e que numa intensidade maior estes talvez não sejam suficientes.

No segundo experimento (2018-II) a prolina apresentou interação entre os fatores, sendo apresentados os gráficos com o desdobramento da interação (Figura 6). Plantas tratadas com bioestimulante apresentaram resposta quadrática, sendo que a produção de óxido nítrico foi elevada nas plantas irrigadas, diminuiu para o potencial -1,38 MPa e aumentou novamente na menor disponibilidade de água.

Figura 6 - Prolina em plantas de soja sob diferentes disponibilidades de água e aplicação de xenobióticos no experimento II (2018-II).



Controle: ns
 Xenobiótico: $-1,28x + 0,14$ $R^2 = 0,68^{**}$
 Bioestimulante: $-3,01x - 1,65$ $R^2 = 0,90^{**}$
 Xen+Bio: $-0,84x - 0,36$ $R^2 = 0,95^{**}$

No menor potencial da água do solo não foi observada diferença entre os tratamentos com xenobióticos. No potencial -1,38 MPa, plantas tratadas com xenobiótico tiveram a maior produção de óxido nítrico, enquanto que no potencial de -0,7 MPa a produção foi maior para as plantas do controle, seguidas das plantas sob

aplicação de fungicida. Nas plantas irrigadas a maior concentração de ON foi observada para as plantas tratadas com o bioestimulante.

A concentração de prolina das plantas apresentou comportamento linear para todos os tratamentos de xenobióticos, tendo sido observada a maior concentração de prolina na menor disponibilidade de água para todos os tratamentos xenobióticos (Figura 6). No potencial -3,09 MPa a maior concentração de prolina foi observada para as plantas tratadas com bioestimulante, enquanto que no potencial -1,38 MPa a maior concentração de prolina foi encontrada nas plantas tratadas com fungicida.

Diferentemente dos resultados apresentados para 2018-I, nesse experimento, plantas de soja sob déficit hídrico, tratadas com bioestimulante tiveram a concentração de prolina aumentada (potencial -3,09 MPa). Isso nos leva a pensar que a concentração de prolina vai modificar a partir de determinado nível de intensidade de estresse. Além disso, é possível notar que as respostas são bastante variáveis dependendo das condições de cultivo.

4.5 Conclusões

Produção aumentada de óxido nítrico e prolina é observada em plantas de soja submetidas a potenciais da água do solo iguais ou menores que -1,38 MPa. Isso pode indicar um limite inferior para início dos efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo desencadeado pelo estresse combinado de déficit hídrico e aplicação de xenobióticos.

No potencial da água do solo de -3,09 MPa as plantas têm a maior concentração de prolina quando tratadas com bioestimulante, indicando que esse pode ser utilizado como um indutor de defesas contra estresses abióticos, quando aplicado após a ocorrência do estresse.

5 CAPÍTULO III

Relações fisiológicas e antioxidantes de soja sob déficit hídrico, xenobióticos e bioestimulante

5.1 Resumo

As plantas enfrentam situações estressantes durante seu ciclo de cultivo e esses fatores de estresse podem acontecer concomitantemente. Algumas alternativas vem sendo utilizadas para minimizar os danos ocasionados pelo estresse. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se o metabolismo fisiológico e bioquímico de plantas de soja é afetado por estresses combinados de déficit hídrico e xenobióticos e se o uso de bioestimulante atua no metabolismo antioxidante da planta. Foi utilizado um delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial, sendo as fontes de variação: água e xenobióticos, e o experimento conduzido em ambiente controlado. As plantas de soja foram mantidas sob condições adequadas de temperatura, umidade e irrigação até o estágio V8. Nesse momento foi retirada a irrigação de uma parte delas, as quais foram mantidas sem irrigação durante sete dias. Ao final desse período foram realizadas as aplicações de fungicidas e bioestimulante (Fox Xpro®, Unizeb Gold®, Foltron Plus® e as combinações) e uma hora após as aplicações iniciaram-se as avaliações fisiológicas e posteriormente as bioquímicas. Foram avaliadas a temperatura foliar, a concentração interna de CO₂, a transpiração, a condutância estomática, a fotossíntese, o conteúdo de clorofila *a*, *b* e total, o conteúdo relativo de água, os danos oxidativos, as espécies reativas de oxigênio e as enzimas e compostos antioxidantes. Alterações fisiológicas foram induzidas pela aplicação de fungicidas em plantas sob condições irrigadas. Aumentos na transpiração, condutância estomática e fotossíntese foram percebidas, indicando que esses produtos, além de serem aplicados com a finalidade de prevenção ou controle de alguma doença, podem acelerar o metabolismo, muitas vezes com potencial de induzir defesas nas plantas. Já a aplicação dos xenobióticos numa condição de estresse por déficit hídrico pode, em alguns casos, levar à intensificação desse estresse, pois além da planta estar tentando evitar a perda de água para manter a turgescência e seus processos vitais, ela terá que metabolizar esse composto, o que poderá resultar num custo metabólico envolvido. O uso de bioestimulante é uma alternativa para minimizar o estresse oxidativo e os danos ocasionados pelos estresses de déficit hídrico e xenobióticos combinados.

Palavras-chave: 1. Estresse oxidativo. 2. Dano de membranas. 3. Fotossíntese. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Fungicida.

5.2 Introdução

A cultura da soja, cultivada em períodos de temperaturas mais elevadas é comumente exposta à condições de falta de água, o que pode acarretar em mudanças

fisiológicas nessas plantas. Dentre essas alterações estão o fechamento estomático, redução na fotossíntese, aumento da temperatura interna e danos em membranas (FAROOQ et al., 2009; NOCTOR et al., 2014; JAVADI et al., 2017; ZANDALINAS et al., 2018). Além disso, dependendo da intensidade do estresse, essas alterações podem desencadear modificações a nível molecular, como aumento na produção de EROs, peroxidação de lipídios, e aumento na atividade de enzimas antioxidantes e produção de compostos antioxidantes (GILL; TUTEJA, 2010; XING et al., 2016; TANG et al., 2017; BLUM, 2017)

No momento de ocorrência da falta de água, além de outros estresses, bióticos ou abióticos, muitas vezes estão sendo realizados os manejos fitossanitários da lavoura, com a aplicação de herbicidas, inseticidas e fungicidas. Os fungicidas, de origem natural ou sintética, são substâncias que promovem a proteção das plantas contra a ação de fitopatógenos (REIS; REIS; CARMONA, 2021). No entanto, para a planta essas substâncias são desconhecidas do seu metabolismo comum, e por isso são consideradas substâncias xenobióticas. Isso faz com que essa aplicação, que tem um propósito benéfico, passe a ser uma potencial causadora de estresse, que nesse caso, se acontecer junto com o déficit hídrico poderá potencializar os danos já ocasionados por esse. Essa situação de estresses combinados é de comum ocorrência no campo e precisa ser explorada para ser melhor compreendida.

Portanto, esse trabalho objetivou avaliar se o metabolismo fisiológico e bioquímico de plantas de soja é afetado por estresses combinados de déficit hídrico e xenobióticos e compreender a ação do bioestimulante no metabolismo antioxidante de plantas em condições estressantes.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Sujeito da pesquisa e local do experimento

Foram utilizadas sementes de soja da cultivar DM 5958 IPRO, caracterizada pelo ciclo super-precoce (grupo de maturação 5.8), flor de coloração roxa, hábito de

crescimento indeterminado e porte médio. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Universidade de Passo Fundo, RS.

Essas plantas se desenvolveram em ambiente controlado, numa câmara de crescimento, sendo mantidas 14 horas de iluminação artificial, com a utilização de lâmpadas fluorescentes e LED intercaladas, de cor branca (temperatura de cor 6400K), e fluxo luminoso de 2.790 lumens. A densidade de fluxo de fótons foi medida com o ceptômetro (ACCUPAR LP-80, DECAGON), sendo obtida a densidade de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. A temperatura do ar e a umidade relativa do ar foram medidas com o datalogger de umidade e temperatura digital (modelo HT-70, Instrutherm), sendo observados valores médios de 64,8% e 25,1 °C. O valor máximo encontrado foi de 27,2 °C para temperatura, e 79,4% para umidade. Os valores mínimos foram 37,5% e 23,0 °C.

5.3.2 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com 3 repetições e os tratamentos delineados em esquema bifatorial, sendo o estresse por déficit hídrico (com e sem), e o fator xenobióticos (controle, Fox Xpro[®], Unizeb Gold[®], Foltron Plus[®], Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], Fox Xpro[®] + Foltron Plus[®], Foltron Plus[®] + Unizeb Gold[®] e Foltron Plus[®] + Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®]) (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Plantas de soja irrigadas (A) controle, (B) bioestimulante Foltron Plus[®], (C) xenobiótico Fox Xpro[®], (D) xenobiótico Unizeb Gold[®], (E) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Unizeb Gold[®], (F) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Fox Xpro[®], (G) xenobióticos Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e, (H) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].

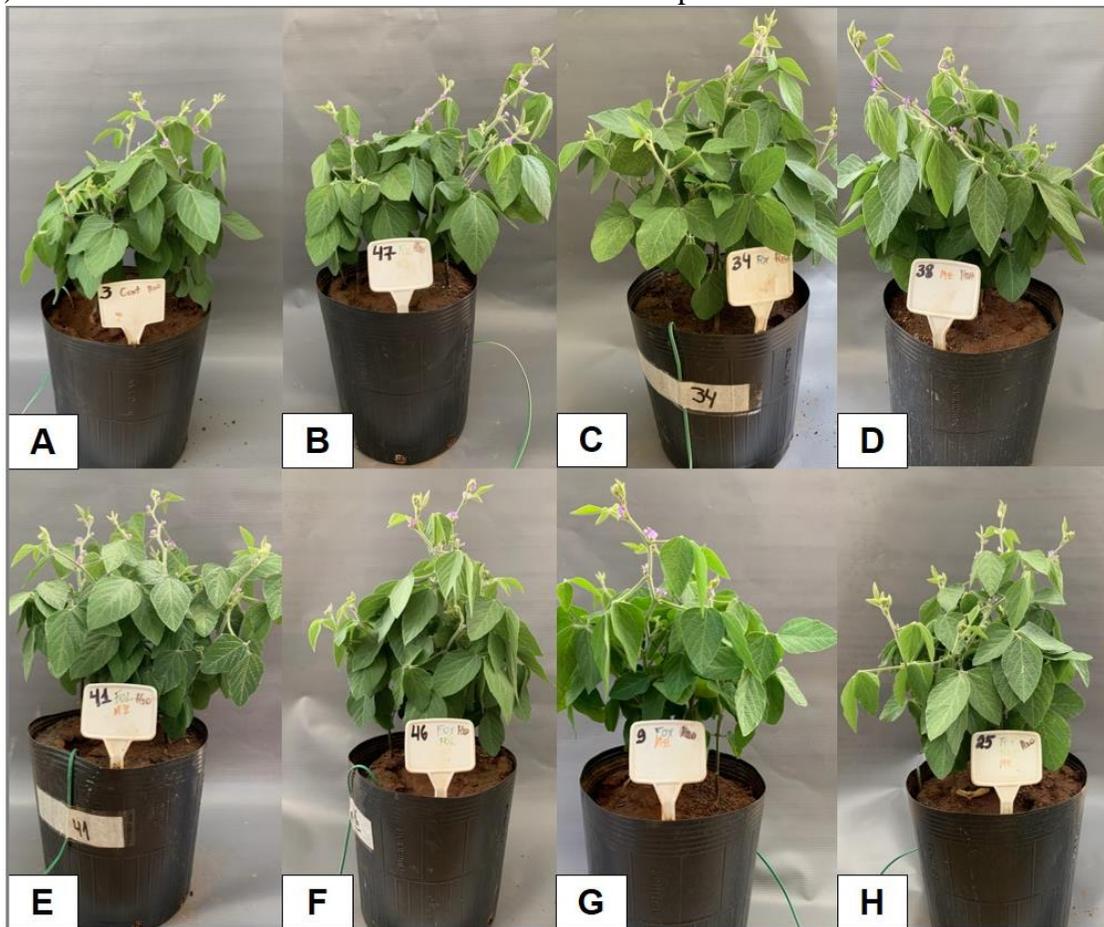
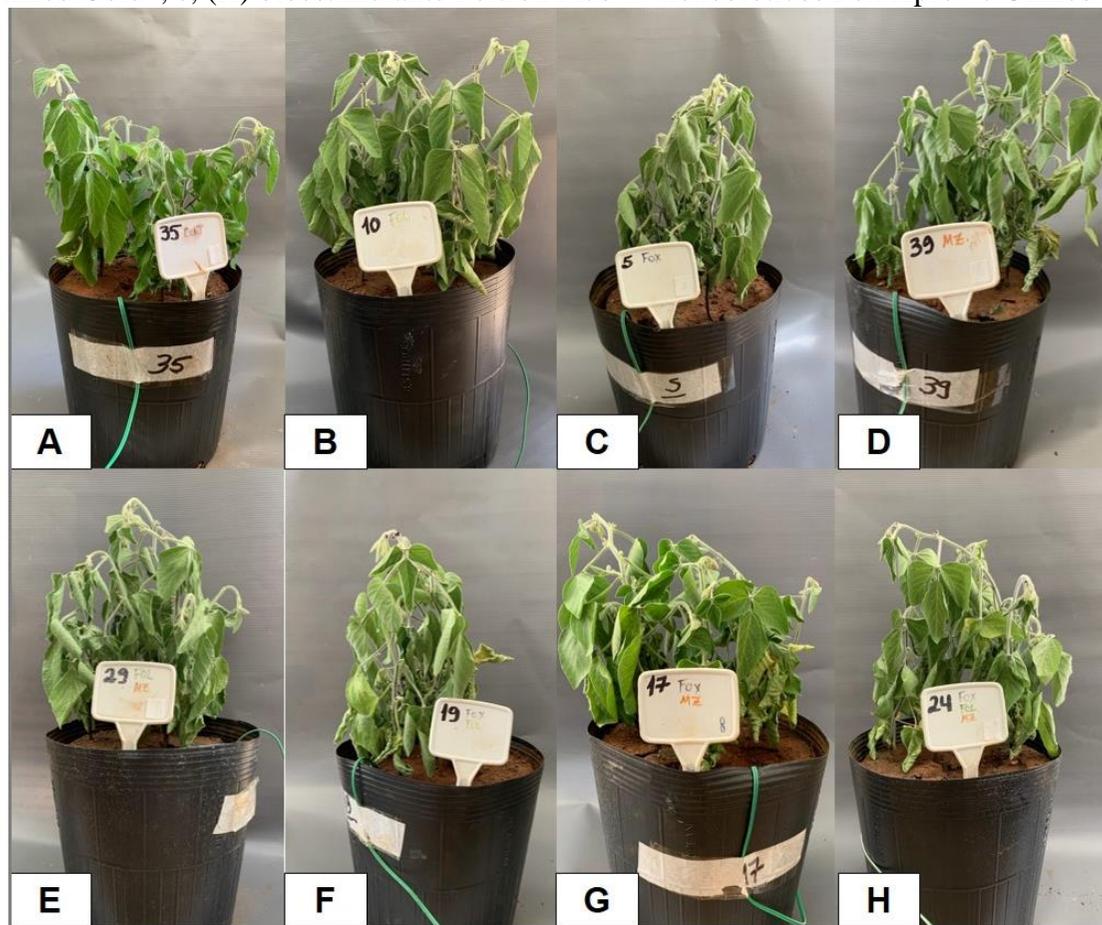


Figura 2 - Plantas de soja sob déficit hídrico (A) controle, (B) bioestimulante Foltron Plus[®], (C) xenobióticos Fox Xpro[®], (D) xenobióticos Unizeb Gold[®], (E) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Unizeb Gold[®], (F) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Fox Xpro[®], (G) xenobióticos Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e, (H) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].



5.3.3 Procedimentos experimentais

Uma mistura contendo solo e substrato (Tabela 1) na proporção de 2:1 foi preparada, sendo bem homogeneizada em uma lona, e colocada em vasos de 11 L. Cada vaso recebeu 8.200 kg da mistura, sendo colocada metade da mistura, até a metade da altura do vaso, acomodado o sensor para medição do potencial da água do solo, centralizado e horizontalmente, e posteriormente colocada a outra metade da mistura.

Tabela 1 - Características químicas e físico-hídricas da mistura solo e substrato.

CTC (pH 7,0)	23,21	cmol _c /dm ³	H⁺	6,19	cmol _c /dm ³	B	0,24	mg/dm ³
CTC (efetiva)	17,02	cmol _c /dm ³	Ca²⁺	12,76	cmol _c /dm ³	Cu²⁺	1,96	mg/dm ³
MO	62,12	g/dm ³	Mg²⁺	3,48	cmol _c /dm ³	Fe²⁺	211,19	mg/dm ³
P-Rem	12,36	mg/L	K⁺	0,56	cmol _c /dm ³	Mn²⁺	57,46	mg/dm ³
pH em CaCl₂	4,77	-	Na⁺	0,22	cmol _c /dm ³	Zn²⁺	2,41	mg/dm ³
pH em H₂O	5,46	-	P (1)	105,03	mg/dm ³	V%	73,33	%
pH em SMP	5,76	-	P (3)	50,79	mg/dm ³	Ds	0,97	g/cm ³
H + Al	6,19	cmol _c /dm ³	SO₄²⁻	55,54	mg/dm ³	Pt	0,62	m ³ /m ³

*CTC: capacidade de troca de cátions; MO: matéria orgânica; P-Rem: fósforo remanescente; pH: potencial hidrogeniônico; CaCl₂: cloreto de cálcio; H₂O: água; H+Al: acidez potencial; H⁺: acidez não trocável; Ca²⁺: cálcio; Mg²⁺: magnésio; K⁺: potássio; Na⁺: sódio; P: fósforo; SO₄²⁻: íon sulfato (enxofre); B: boro; Cu²⁺: cobre; Fe²⁺: ferro; Mn²⁺: manganês; Zn²⁺: zinco; V%: saturação de bases; Ds: densidade do solo; Pt: porosidade total.

O sensor de potencial da água no solo utilizado foi o modelo 253-L da Campbell Scientific. Fabricado pela Watermark, é um dispositivo sensor de resistência elétrica que estima o potencial da água no solo. Os sensores foram conectados a multiplexadores de séries do tipo AM16/32, e esses por sua vez conectados ao registrador de dados (datalogger CR1000X), o qual coleta e armazena os dados a partir da programação enviada através do software PC200W.

Após a preparação do solo e sensor nos vasos, o solo foi umedecido gradualmente com dois litros de água, para homogeneizar a umidade na região ao redor do sensor. Foram então depositadas oito sementes de soja em cada vaso, numa

profundidade de 3 cm, aproximadamente. Após a germinação e emergência foi realizado o desbaste das plantas, sendo mantidas quatro em cada vaso.

As plantas receberam a mesma quantidade de água até 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). Neste momento foram submetidas às diferentes disponibilidades de água, sendo a que a irrigada continuou a receber irrigação, enquanto que o tratamento submetido ao déficit hídrico teve restrição de água durante o período de sete dias.

Quando as plantas submetidas ao déficit hídrico se encontravam visivelmente murchas, com a turgescência impactada, foi realizada a aplicação dos xenobióticos. A aplicação foi realizada utilizando um pulverizador costal de pressão constante, pressurizado com CO₂, equipado com uma barra de 1,5 m e três pontas jato plano defletor, modelo TT 11002, espaçadas de 50 cm. O volume de aplicação foi de 150 L/ha e pressão de 2 bar.

O fungicida Unizeb Gold[®] é composto por mancozebe (etileno bis-ditiocarbamato de manganês e zinco na concentração de 750 g/kg (75% m/m) e outros ingredientes, na concentração de 250 g/kg (25% m/m), e foi aplicado na dose de 2 kg/ha. O fungicida Fox Xpro[®] é composto por azoxistrobina, protioconazol e carboxamida e foi aplicado na dose de 0,5 L/ha. Na aplicação de Fox foi adicionado o adjuvante Aureo[®] (Bayer), composto por éster metílico de óleo de soja (720 g/L) e outros ingredientes (188 g/L), na dose de 0,25%. O bioestimulante Foltron Plus[®] é composto por folcisteína, giberelina, ácidos fúlvicos, além de nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, boro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco) utilizado na dose de 1 L/ha.

Após uma hora das aplicações iniciaram-se as avaliações das plantas, sendo determinadas variáveis fisiológicas. Após isso, foram coletadas amostras para avaliações bioquímicas. Posteriormente foram coletadas trifólios para detecção *in situ*

do peróxido de hidrogênio, e outros trifólios para retirada de discos foliares, para estimativa do conteúdo relativo de água, e para quantificação dos danos do estresse.

5.3.4 Avaliações fisiológicas

Em relação à temperatura foliar, concentração interna de CO₂, transpiração, condutância estomática, e fotossíntese, foram realizadas três medições por tratamento no folíolo central do sexto trifólio totalmente expandido. Foi utilizado um analisador de gases infravermelho (IRGA; Modelo: LCA PRO, Analytical Development Co, Ltd, Hoddesdon, UK), utilizando o fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (1.500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e concentração externa de CO₂ (Ca, 400 ppm) constantes e a umidade relativa (60%) e temperatura (25 °C) ambientes. As medições foram realizadas no período das 8 horas às 10 horas da manhã para obtenção da taxa de assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), condutância estomática (gs, $\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), taxa de transpiração (E, $\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e a concentração intracelular de CO₂ (Ci, $\mu\text{mol}/\text{mol}$).

Os teores de clorofila *a*, *b* e total: foram medidos no folíolo central do quarto trifólio totalmente expandido, por meio de um clorofilômetro (Marca: Falker, Modelo: ClorofiLog). A medição da clorofila ocorreu um dia após a aplicação dos xenobióticos. A utilização desse equipamento permite a obtenção do índice de clorofila Falker (ICF), que é um valor adimensional relativo do conteúdo de clorofila e é baseado em correlações de absorvância e reflectância.

O conteúdo relativo de água das plantas foi estimado através da metodologia de Cavalcanti et al. (2004), sendo realizado oito horas após a aplicação dos xenobióticos. O sexto trifólio totalmente expandido de cada planta do vaso foi coletado com auxílio de uma tesoura e desse foram retirados 30 discos foliares, com auxílio de um vazador, com diâmetro de 1 cm. Estes foram então imediatamente pesados em balança analítica, e então colocados imersos em água destilada durante sete horas, sob luz de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e temperatura de 25 °C. Após decorrido esse tempo, os discos foram retirados da água, levemente enxugados em um papel toalha, e então pesados novamente. Foram colocados em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar, sob temperatura de

60 °C até massa constante, e novamente realizada a pesagem dos mesmos. Com os dados das três pesagens foi possível estimar o conteúdo relativo a partir da fórmula: Conteúdo relativo de água (%) = [(massa discos frescos – massa discos secos) / (massa discos túrgidos – massa discos secos) * 100].

5.3.5 Avaliações bioquímicas

O dano oxidativo de membrana (%) foi estimado a partir da metodologia proposta por Cavalcanti et al. (2004). A peroxidação dos lipídios (mmol/mg proteína) foi estimada a partir da concentração de malondialdeído (MDA), de acordo com a metodologia de Heath; Packer (1968). A condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) é uma variação do método de dano de membrana. As metodologias estão descritas com detalhamento no capítulo I. O dano de membrana e o dano estimado pela condutividade elétrica foram avaliados no quinto trifólio totalmente expandido.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) foi quantificado de acordo com adaptação do método de Loreto; Velikova (2001). O H_2O_2 também foi quantificado qualitativamente a partir da técnica de detecção *in situ*, de acordo com a metodologia de Thordal-Christensen et al. (1997). A concentração de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (mmol mg proteína/min) foi determinada de acordo com a metodologia de Chaitanya; Naithani (1994). As metodologias estão descritas com detalhamento no capítulo I.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) (μmol mg proteína/min) foi quantificada pela metodologia de Nakano; Asada (1981). A enzima catalase (CAT) (mmol mg proteína/min) teve sua atividade determinada pelo método de Cakmak; Marschner (1992). A atividade da superóxido dismutase (SOD) (unidade de SOD/mg proteína) foi determinada pela capacidade da enzima em reduzir o azul de nitro-tetrazólio, de maneira fotoquimicamente, conforme proposto por Del Longo et al. (1993).

O conteúdo de tiois não proteicos é uma medida indireta, simples e barata para quantificar a glutatona e foi estimado pela metodologia de Griffith (1980). A

concentração de nitritos ($\mu\text{mol/mg}$ proteína), uma medida indireta do óxido nítrico, foi avaliada a partir da metodologia de Bracht; Ishii-Iwamoto (2003). A determinação de prolina ($\mu\text{mol/mg}$ proteína) seguiu o princípio do método original proposto por Bates; Waldren; Teare (1973), porém com uma adaptação bem atual, que propõe um método bem mais rápido, eficiente, e mais ecologicamente correto (SHABNAM et al., 2015).

Para determinação da proteína (mg/mL) foi utilizado o método do comassie (BRADFORD, 1976).

Os últimos trifólios emitidos pela planta, em que as bordas dos folíolos não estavam se tocando, foram cuidadosamente coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para a obtenção de extrato enzimático. Esse material foi posteriormente macerado em cadinhos com pistilo e adicionado nitrogênio líquido. Então, homogeneizou-se esse material com oito vezes a sua massa com uma solução tampão (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico e fosfato monopotássico). Centrifugou-se numa rotação de 3000 rpm e força G de 2000, durante dez minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C (Marca: Eppendorf, Modelo: 5430 R). O sobrenadante foi pipetado e armazenado em eppendorfs a -80 °C (ultrafreezer) até a realização das análises.

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade de resíduos e ao teste de Levene para verificação da homocedasticidade das variâncias. As variáveis com distribuição dos resíduos não normal tiveram seus dados transformados pela raiz quadrada (condutância estomática, fotossíntese, clorofila *b* e óxido nítrico) e pelo do logaritmo neperiano (transpiração, dano de membrana e prolina). A análise de variância foi realizada a partir do teste F, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas no software RStudio (R Core Team, 2018) e o pacote utilizado foi o ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018). Também foram feitas análises de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, com o uso do pacote

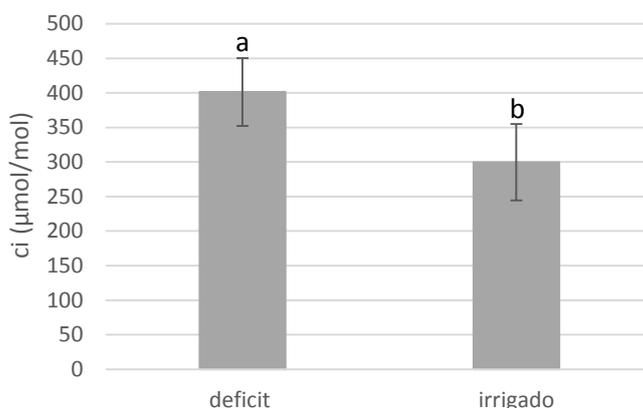
corrplot, e análise multivariada utilizando o método de componentes principais, pelos pacotes FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008) e factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2020).

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Temperatura foliar, trocas gasosas e fotossíntese

As avaliações fisiológicas de trocas gasosas tiveram distintas respostas. A temperatura foliar não variou entre os tratamentos. A concentração interna de CO₂ foi alterada apenas para o manejo diferenciado da irrigação, sendo que plantas sob déficit hídrico apresentaram maior concentração intracelular de CO₂, em torno de 100 µmol/mol a mais em comparação com as plantas irrigadas (Figura 3).

Figura 3 - Concentração interna de CO₂ (ci) em plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de xenobióticos e bioestimulante.



Nota: Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

Plantas sob déficit hídrico, sem água para absorver do solo, fecham os estômatos para evitar a perda de água. Assim, não transpiram e não realizam a fotossíntese, elevando os teores intracelulares de CO₂. Seriam esperados com isso mudanças também com relação à temperatura foliar, uma vez que a planta realiza o resfriamento por meio da perda de água por transpiração, mas essas diferenças não foram observadas.

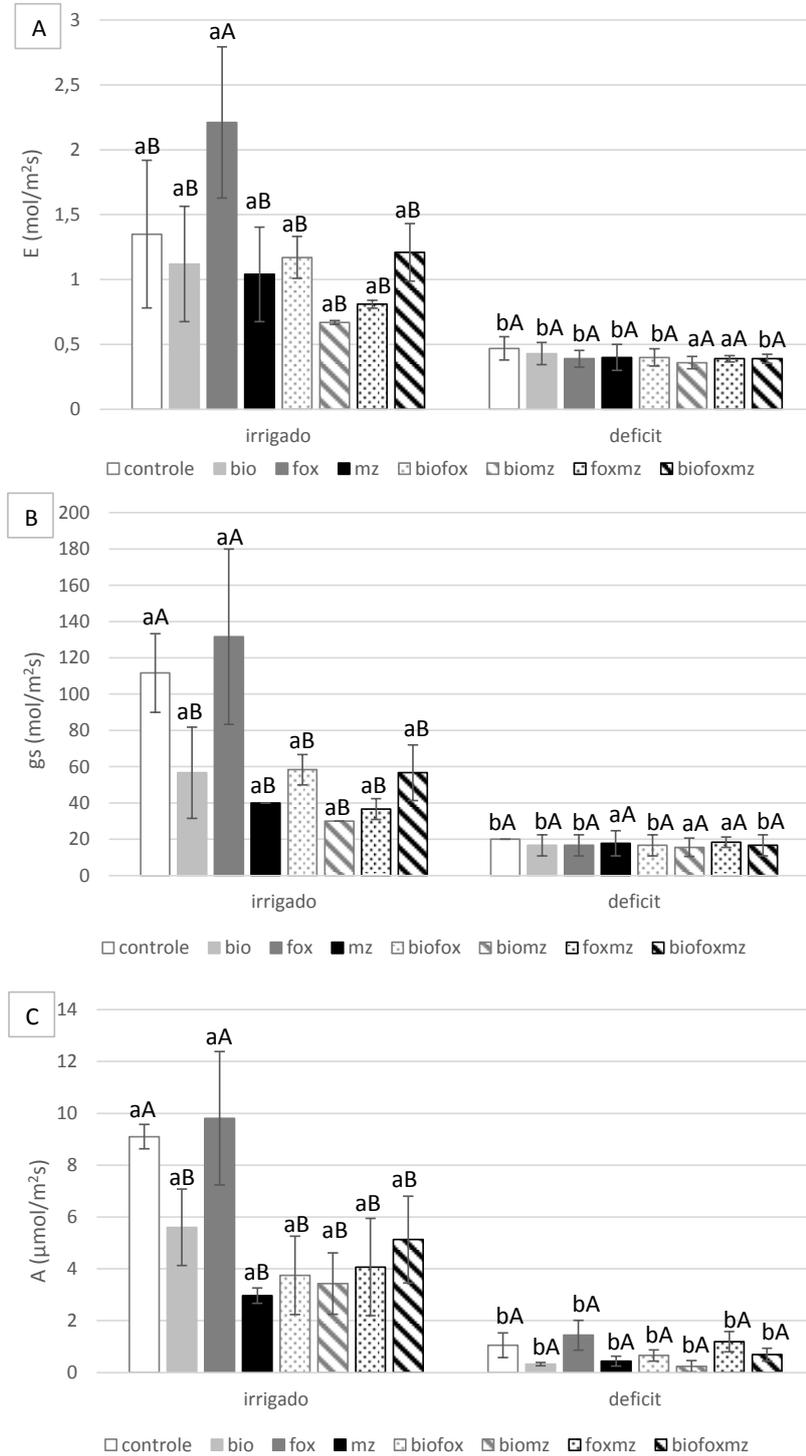
A transpiração, a condutância estomática e a fotossíntese apresentaram interações entre os dois fatores de variação considerados no estudo, água e xenobióticos (Tabela 5 - apêndice). A maior transpiração foi observada nas plantas irrigadas tratadas com Fox Xpro[®] (Figura 4A). Plantas irrigadas apresentaram maior transpiração, com exceção dos tratamentos que receberam a combinação do fungicida Unizeb Gold[®] com o fungicida Fox Xpro[®] e a combinação do Unizeb Gold[®] com o bioestimulante Foltron Plus[®], tratamentos esses que não diferiram entre irrigado e déficit hídrico. Plantas sob déficit hídrico não diferiram entre si com relação à transpiração.

A condutância estomática (gs) também não diferiu entre os tratamentos xenobióticos nas plantas sob déficit hídrico (Figura 4B). Nas plantas irrigadas maiores trocas gasosas foram observadas para as plantas do controle e para as plantas que receberam a aplicação de Fox Xpro[®]. Assim como a transpiração, a condutância estomática foi maior para as plantas irrigadas, com exceção das plantas tratadas com Unizeb Gold[®], quando isolado ou nas combinações com o Fox Xpro[®] e com o Foltron Plus[®], as quais não diferiram com relação ao manejo da água.

A fotossíntese apresentou resposta muito semelhante à gs, sendo que considerando os diferentes tratamentos xenobióticos nas plantas irrigadas, o controle e a aplicação de Fox Xpro[®] resultaram em plantas com maior atividade fotossintética (Figura 4C). Quando comparados os manejos de irrigação, plantas irrigadas apresentaram maior fotossíntese que plantas sob déficit hídrico, independente do tratamento xenobiótico apresentado.

Maiores transpirações, trocas gasosas e fotossíntese em plantas irrigadas estão relacionadas à presença de água na planta, a qual está em pleno funcionamento. Abre estômatos, entra CO₂, realiza fotossíntese, libera O₂ juntamente com a água e calor. No caso de plantas sob estresse por déficit hídrico, com pouca água no solo para ser absorvida pelas raízes, para evitar a perda de turgescência de suas células, ela fecha os estômatos, não saindo vapor de água, e limitando a entrada de CO₂, reduzindo assim trocas gasosas, transpiração e conseqüentemente, a fotossíntese.

Figura 4 - Transpiração (A), condutância estomática (B) e fotossíntese (C) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold® e bioestimulante Foltron Plus®.



Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey (p<0,05). As barras verticais representam o ± desvio padrão das amostras.

5.4.2 Pigmentos fotossintéticos

A clorofila **a** foi maior nas plantas do controle e tratadas com Fox Xpro[®] e Foltron Plus[®] quando submetidas a estresse por déficit hídrico, em comparação às irrigadas (Figura 5A). Quando foram comparados os tratamentos dentro da condição irrigada foram observados maiores valores de clorofila **a** para Foltron Plus[®] e Unizeb Gold[®], Foltron Plus[®], Unizeb Gold[®] e Fox Xpro[®], Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®] e Foltron Plus[®]. Já para plantas submetidas à déficit hídrico foi observada maior clorofila **a** para Foltron Plus[®] e Unizeb Gold[®], que não diferenciou de Fox Xpro[®] e controle.

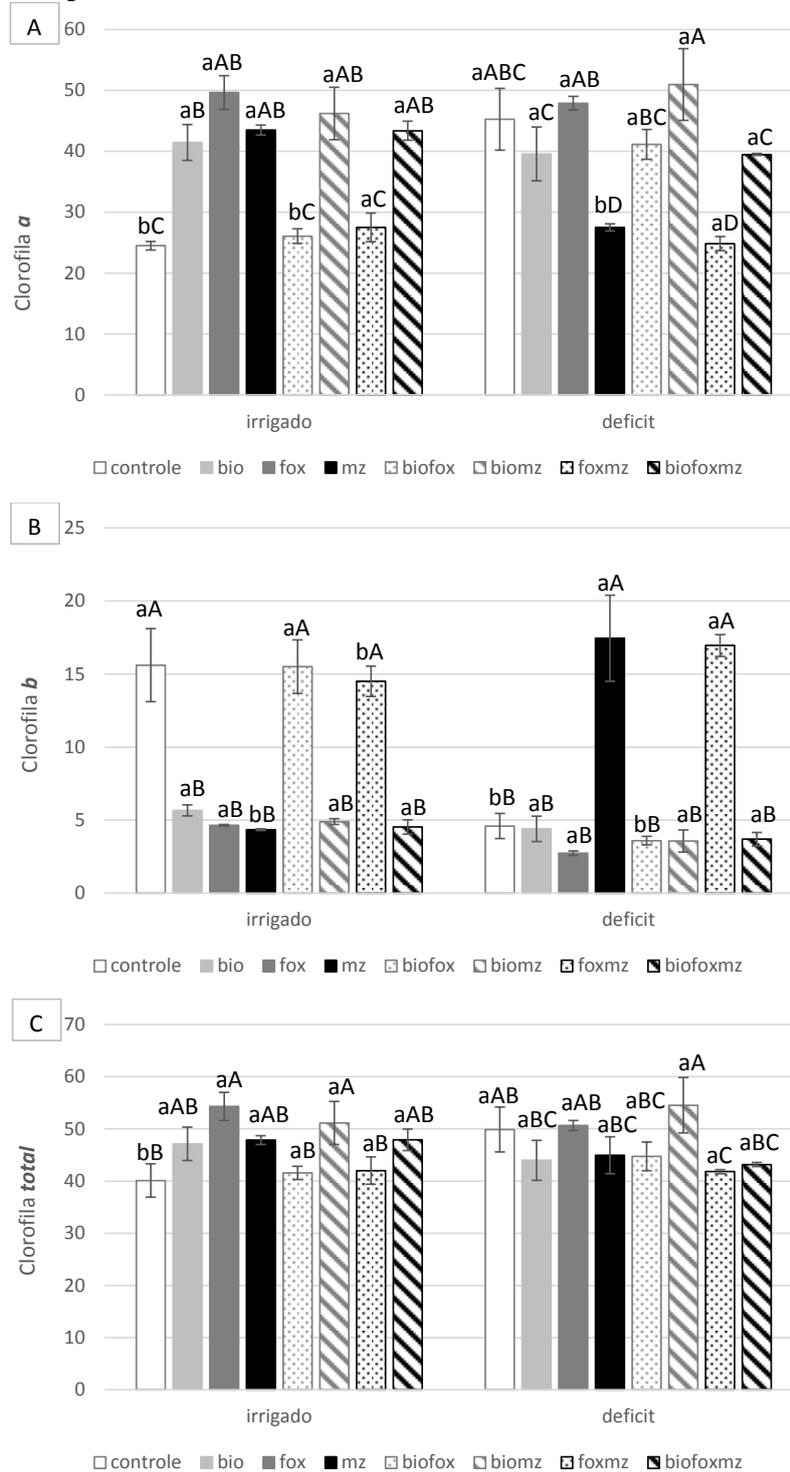
A clorofila **b** aumentou na condição de déficit hídrico para os tratamentos Unizeb Gold[®] isolado e combinado com Fox Xpro[®] (Figura 5B). Em contrapartida, maior clorofila **b** foi observada no controle e Foltron Plus[®] + Fox Xpro[®] no tratamento irrigado, em comparação com as plantas sob déficit.

A clorofila total respondeu de maneira semelhante à clorofila **a**, podendo-se destacar valores mais altos de clorofila para Foltron Plus[®] + Unizeb Gold[®] e Fox Xpro[®] no tratamento irrigado, e além destes, as plantas do controle para as plantas submetidas ao déficit hídrico (Figura 5C).

As clorofilas **a** e **b** são os pigmentos responsáveis por capturar a energia solar e transformar em energia química, através da fotossíntese. No entanto, foram observadas mudanças bastante súbitas no que diz respeito ao processo fotossintético, em plantas submetidas à déficit hídrico, as quais não foram acompanhadas de alterações nas moléculas clorofilas.

As respostas de controle de perda de água numa condição de déficit, como o fechamento estomático, diminuição de concentração interna de CO₂, diminuição de trocas gasosas e transpiração, se mostraram alterações bem imediatas, enquanto que a estrutura dos pigmentos não teve alterações tão significativas no tempo de avaliação do experimento.

Figura 5 - Clorofila *a* (A), Clorofila *b* (B) e Clorofila total (C) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold® e bioestimulante Foltron Plus®.

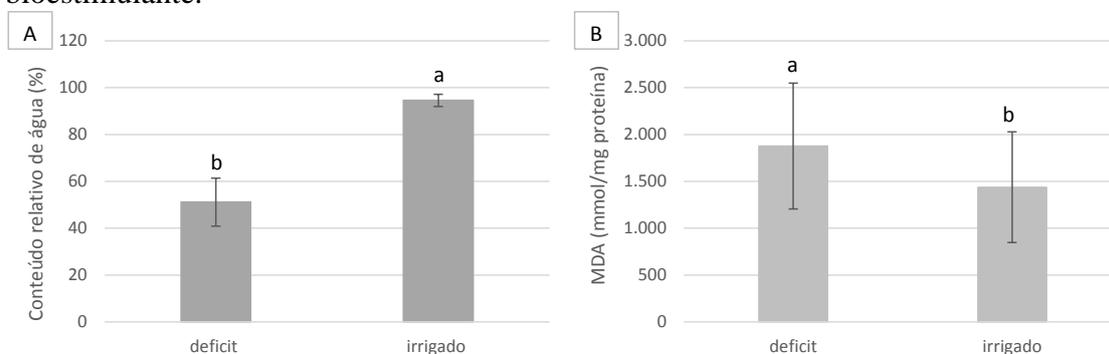


Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

5.4.3 Conteúdo relativo de água e danos em membranas

O conteúdo relativo de água foi maior para as plantas irrigadas, chegando a mais de 90%, enquanto que as plantas sob déficit hídrico tiveram redução de quase 50% (Figura 6A). A aplicação de xenobióticos e bioestimulante não variou o conteúdo de água das plantas.

Figura 6 - Conteúdo relativo de água (A) e malondialdeído (B) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos e bioestimulante.



Nota: Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

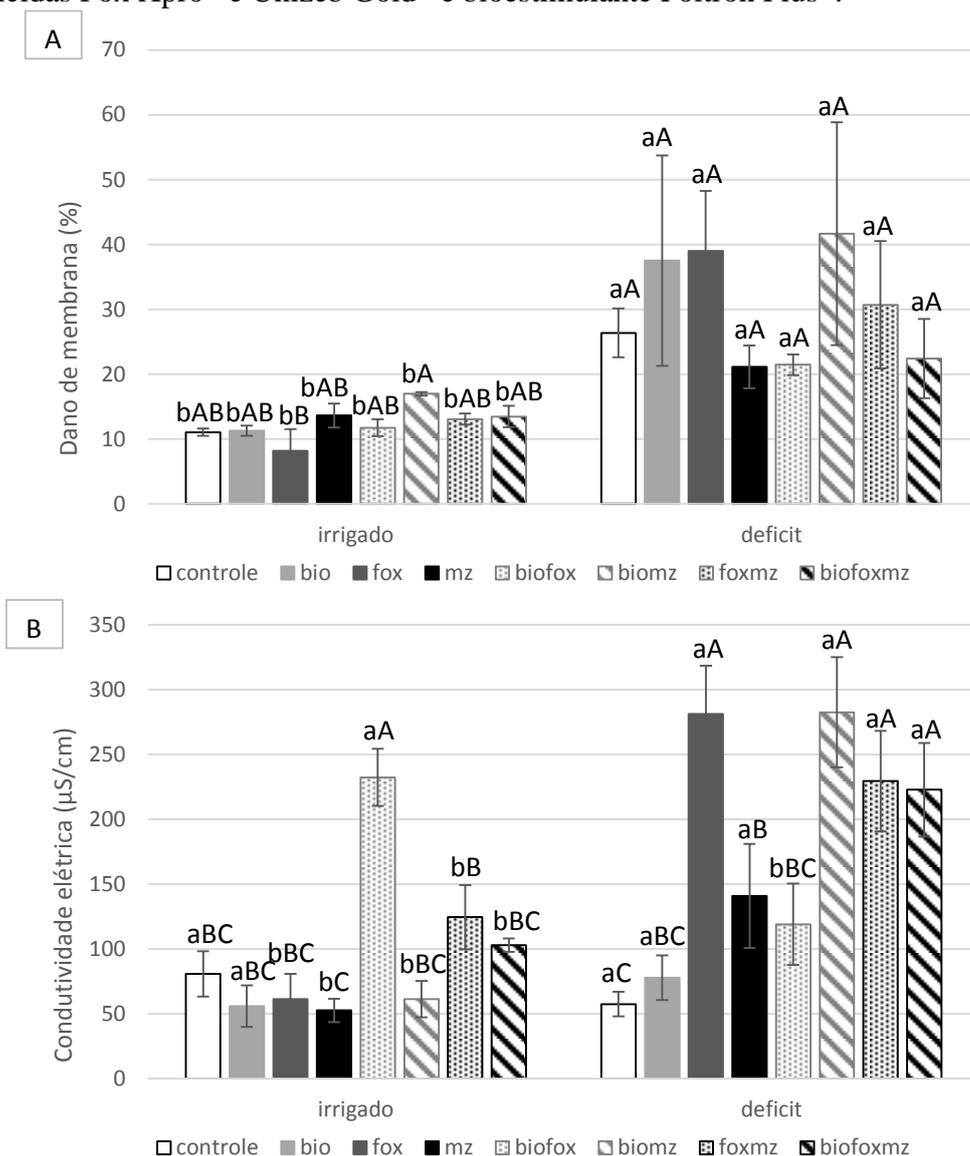
Plantas sob déficit hídrico apresentaram maior conteúdo de MDA em comparação às irrigadas, sendo um aumento de mais de 400 mmol/mg proteína no conteúdo de malondialdeído (Figura 6B). As plantas não apresentaram variações no conteúdo de MDA quando comparadas com os tratamentos xenobióticos.

Maior conteúdo de malondialdeído (MDA) indica maior dano em lipídios, ou seja, maior peroxidação lipídica. O aumento na produção desse composto se deu provavelmente pela indução de defesas frente à produção de espécies reativas de oxigênio, e ao seu potencial causador de dano.

No mesmo sentido foi utilizada a metodologia de estimativa de dano de membrana, sendo que essa variável apresentou interação entre os fatores. Na

comparação do déficit hídrico com o tratamento irrigado, o dano de membrana foi maior nas plantas submetidas à déficit hídrico para todos os tratamentos xenobióticos (Figura 7A). O percentual médio de dano sofrido pelas plantas sob déficit foi mais de 15% maior que do tratamento irrigado.

Figura 7 - Dano de membrana (A) e condutividade elétrica (B) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold® e bioestimulante Foltron Plus®.



Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

A condutividade elétrica, que é outra metodologia capaz de estimar o dano sofrido pelas plantas foi maior nas plantas submetidas ao déficit hídrico somente para os tratamentos Fox Xpro[®], Unizeb Gold[®], Foltron Plus[®] e Unizeb Gold[®], Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®] e Foltron Plus[®], Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®] (Figura 7B). Plantas do controle e apenas do tratamento de Unizeb Gold[®] não diferenciaram-se com relação aos manejos de disponibilidade hídrica.

Já as plantas de Foltron Plus[®] + Fox Xpro[®] tiveram resposta contrária, sendo maior dano observado em plantas irrigadas. Depois dessa combinação e comparando os tratamentos xenobióticos dentro da condição irrigada, a condutividade elétrica foi maior para as plantas tratadas com Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®]. Quanto maior o valor obtido de condutividade elétrica maior é o dano porque maiores valores de condutividade ocorrem devido ao rompimento das membranas e extravasamento dos eletrólitos.

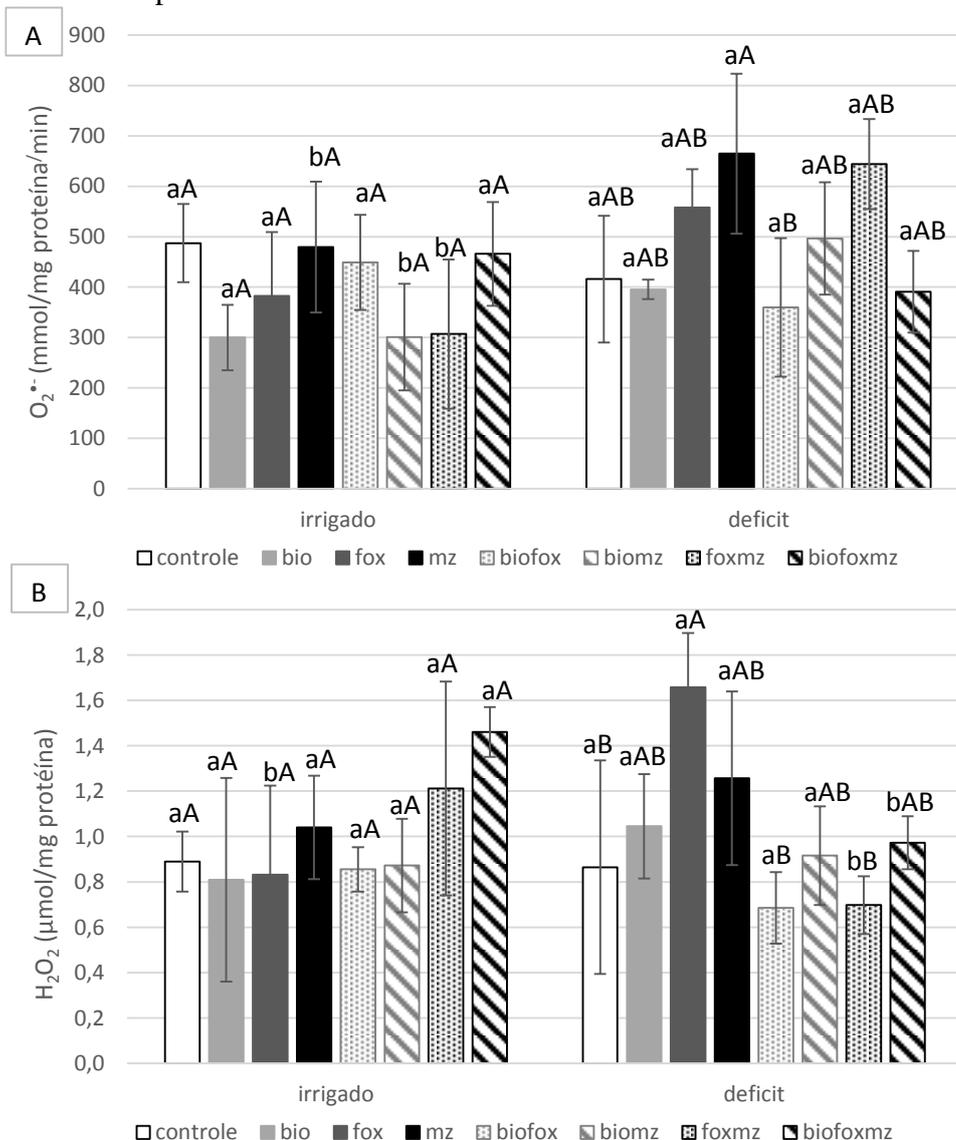
Esses danos oxidativos estão relacionados com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Plantas numa condição de falta de água, fecham estômatos, evitando a perda de água, diminuem a fotossíntese, resultando em aumento de elétrons livres nas células, os quais se ligam ao oxigênio, desencadeando a formação de espécies reativas de oxigênio.

Dependendo da intensidade do estresse, da duração, da espécie, e do tipo de tecido avaliado, a resposta da planta frente à essa condição desfavorável pode ser diferente. Assim sendo, as EROs são responsáveis por funções essenciais de sinalização de situações de estresse, assim como se forem produzidas e acumuladas nas células da planta podem ser tóxicas e causar efeitos danosos.

5.4.4 Espécies reativas de oxigênio

A produção do superóxido foi aumentada em plantas submetidas à déficit hídrico nos tratamentos Unizeb Gold[®], Foltron Plus[®] e Unizeb Gold[®] e Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®] (Figura 8A). Os tratamentos xenobióticos não diferiram entre si na condição irrigada.

Figura 8 - Conteúdo de superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold® e bioestimulante Foltron Plus®.



Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

Plantas sob déficit hídrico tratadas com Unizeb Gold® isolado apresentaram maior produção de superóxido em comparação às plantas tratadas com a combinação de Unizeb Gold® e Fox Xpro®. A concentração de superóxido das plantas tratadas com Unizeb Gold® não diferiu da concentração do tratamento isolado com Fox Xpro®. Da

mesma forma, plantas tratadas com Fox Xpro[®] tiveram concentração de superóxido semelhante àsquelas do tratamento de Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].

Isso corrobora com as conclusões de Mittler (2006) que indica que a resposta de uma combinação de dois estresses não é apenas a soma das respostas a estes fatores isolados, pois a exposição da planta a estresses multifatoriais é uma condição diferente.

A produção de peróxido de hidrogênio, diferentemente do esperado, foi maior em plantas irrigadas em comparação com plantas sob déficit hídrico, nos tratamentos Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e Foltron Plus[®] + Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®] (Figura 8B). Já a produção dessa ERO foi favorecida pela aplicação de Fox Xpro[®] na condição de déficit hídrico.

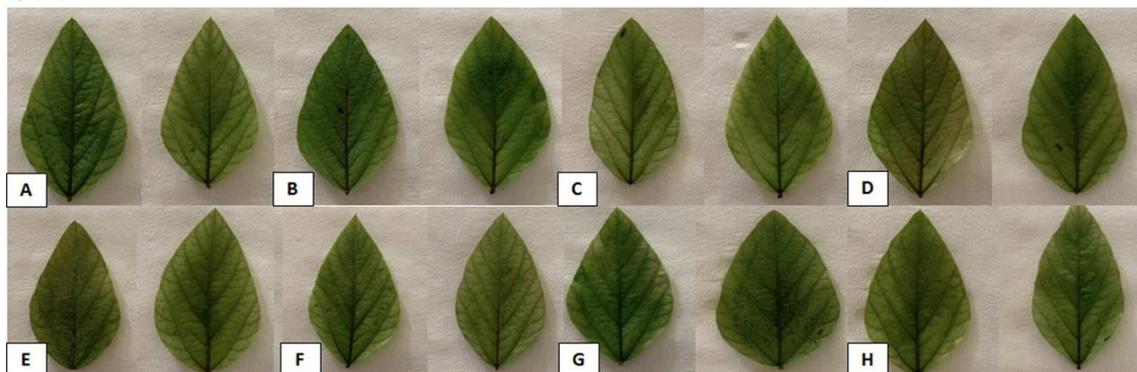
Acumulação de EROs também foram observadas pela aplicação de herbicida, sendo considerado pelos autores como uma espécie de estresse químico causado nas células em decorrência de ser um composto xenobiótico à planta (OULD SAID et al., 2021).

Além da quantificação do peróxido de hidrogênio produzido nas células é utilizada uma técnica que detecta *in situ* a formação de peróxido, podendo ser utilizada para diferenciar qualitativamente tratamentos, com e sem exposição ao estresse. Fotografias dos folíolos dos trifólios das plantas irrigadas indicam uma menor produção dessa ERO numa condição de presença de água para ser utilizada pelas plantas (Figura 9).

Em um trabalho anterior, comparando quatro condições de disponibilidade hídrica, o peróxido de hidrogênio apresentou um aumento linear com o aumento de dias de déficit hídrico (SCHNEIDER et al., 2020). Já o superóxido apresentou um pico de produção, sendo que a maior produção não coincidiu com o estresse de maior intensidade. Isso demonstra que a resposta é bem variável e ela parece estar relacionada a uma variação temporal, visto que a partir do oxigênio a primeira espécie a ser formada é o superóxido. Quando o metabolismo antioxidante atua na dismutação dessa espécie

reativa, um subproduto é o peróxido de hidrogênio que também poderá ser combatido por antioxidantes, tanto por via enzimática como não-enzimática.

Figura 9 - Folíolos centrais de trifólios de plantas de soja irrigadas (A) controle, (B) bioestimulante Foltron Plus[®], (C) xenobiótico Fox Xpro[®], (D) xenobiótico Unizeb Gold[®], (E) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Unizeb Gold[®], (F) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Fox Xpro[®], (G) xenobióticos Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e, (H) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].



Visualmente é possível verificar uma maior produção de peróxido de hidrogênio, observada a partir de pontuações marrom-avermelhado em plantas que receberam a aplicação do fungicida Unizeb Gold[®] e do bioestimulante Foltron Plus[®] (E, F e G). Corrobora com a quantificação nos tecidos a maior presença na combinação de Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].

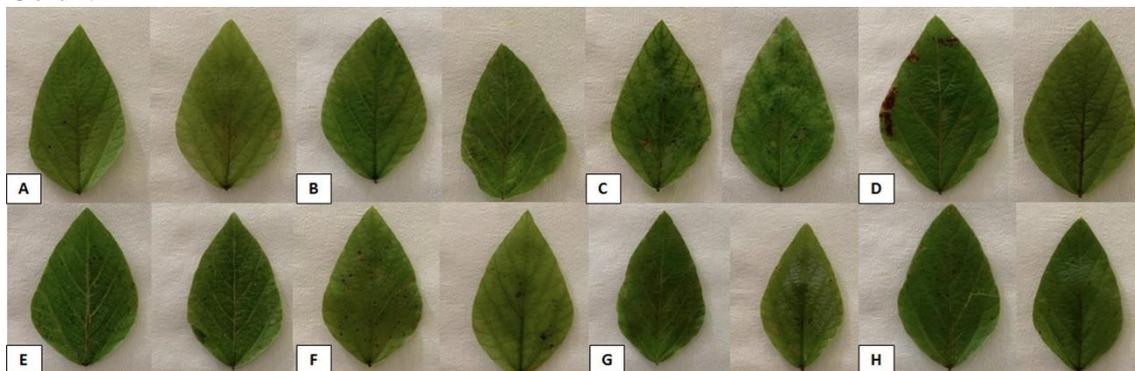
É importante lembrar que as EROs são essenciais ao desenvolvimento das plantas e são produzidas pelo metabolismo normalmente. Quando mantidas em níveis basais participam de funções como a regulação metabólica, diferenciação e desenvolvimento, transdução de sinal e funções relacionadas à sinalização e aclimação em situações de estresse (MITTLER, 2017). Assim, aplicações de substâncias, como fungicidas e bioestimulantes, podem estimular o aumento dessas espécies, que nem sempre estarão em níveis prejudiciais às plantas, com potencial causador de danos.

Na condição de estresse pode-se destacar a maior produção nas plantas sob aplicação isolada do Fox Xpro[®] (Figura 10C), o que também foi observado quantitativamente. Presença considerável de pontuações também foi notada nas plantas

sob aplicação do Fox Xpro[®] combinada com o bioestimulante Foltron Plus[®] (Figura 10F).

O metabolismo antioxidante é ativado quando a planta emite uma sinalização de que as espécies reativas de oxigênio (HASANUZZAMAN et al., 2020), essenciais em níveis basais e passíveis de danos em elevadas concentrações, estão sendo acumuladas nas células. Muitas vezes, principalmente numa condição de estresse (adversa), há um gasto energético relacionada com o aumento na atividade do metabolismo antioxidante de defesa. A literatura tem demonstrado que esse gasto energético pode ser diminuído com a adição de algumas substâncias, que podem fornecer à planta substratos para a produção de compostos antioxidantes, como é o caso de bioestimulantes. Essas substâncias são uma alternativa sustentável para incrementar a produção em situações de estresse (ROUPHAEL; COLLA, 2020).

Figura 10 - Folíolos centrais de trifólios de plantas de soja sob déficit hídrico (A) controle, (B) bioestimulante Foltron Plus[®], (C) xenobiótico Fox Xpro[®], (D) xenobiótico Unizeb Gold[®], (E) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Unizeb Gold[®], (F) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobiótico Fox Xpro[®], (G) xenobióticos Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e, (H) bioestimulante Foltron Plus[®] + xenobióticos Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®].



Além da atividade bioestimuladora, proporcionada pelo aminoácido folcisteína e pelo hormônio giberelina, no caso do Foltron Plus[®], outros componentes, como nutrientes, podem ter ação indireta na amenização dos efeitos causados pelo estresse (HASANUZZAMAN et al., 2021 a). Assim, ao fornecer insumos externos, a planta aumenta sua eficiência metabólica.

O sistema de defesa das plantas, aliado aos genes, fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras, são os reguladores das respostas complexas das plantas frente às condições adversas a que estas estão expostas, auxiliando, portanto, no enfrentamento das situações estressantes (HASANUZZAMAN et al., 2021 a).

5.4.5 Antioxidantes

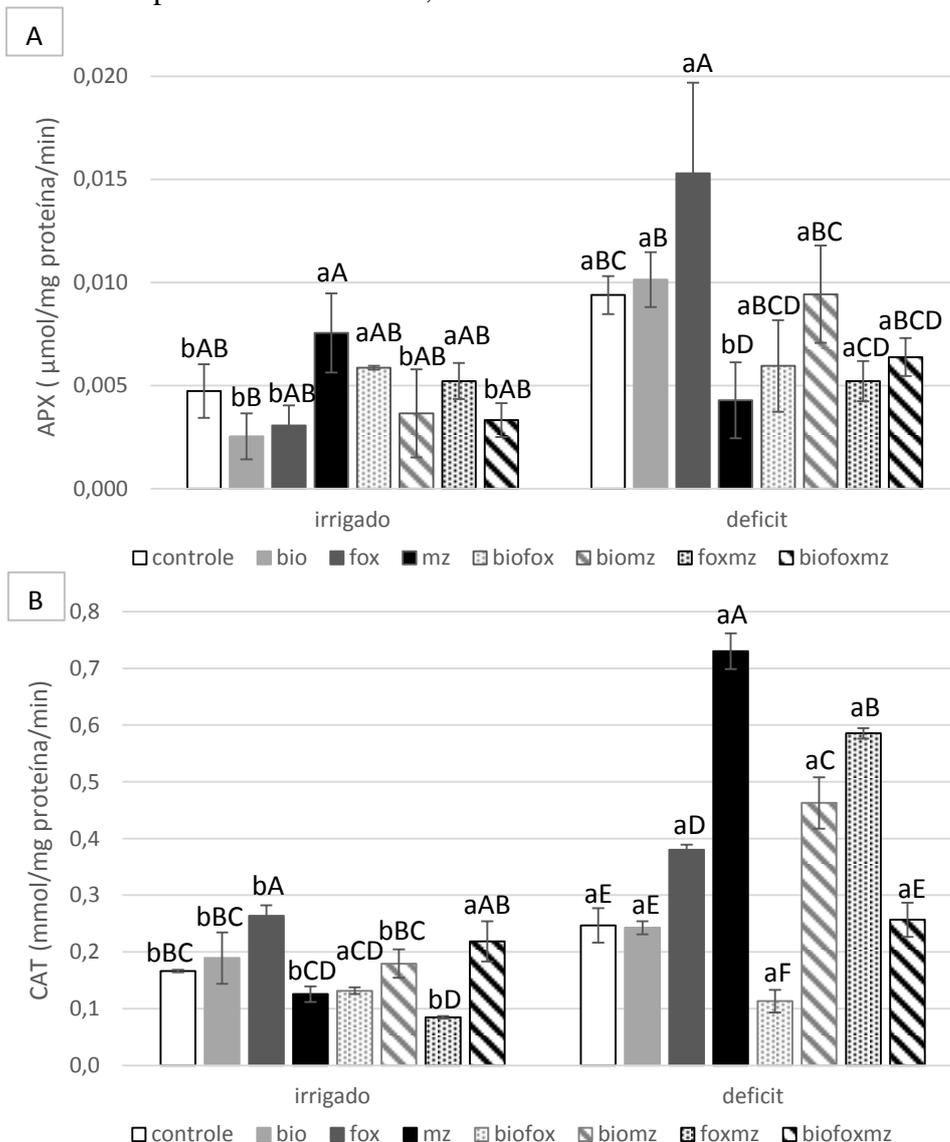
A maior atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) foi observada para as plantas de soja expostas à condição de déficit hídrico e aplicação do fungicida Fox Xpro[®] (Figura 11A).

A avaliação das espécies reativas de oxigênio nas células dessas plantas também indicou uma concentração elevada. Assim, é muito provável que uma maior concentração de EROs tenha levado a um acúmulo nessas células e à percepção da planta em aumentar sua atividade antioxidante enzimática, numa tentativa de neutralizar o excesso dessas moléculas e evitar a ocorrência de danos.

A catalase (CAT) teve sua maior atividade na condição de déficit hídrico com a aplicação de Unizeb Gold[®]. Assim, nem sempre a maior atividade enzimática vai estar diretamente ligada à uma maior concentração de EROs nas células. Muitas vezes a aplicação de xenobióticos induzem a maior atividade enzimática, devido à composição dos fungicidas, que podem conter alguns co-fatores enzimáticos, como é o caso do Unizeb Gold[®].

Ainda destaca-se as diferenças entre a aplicação isolada e combinada dos xenobióticos. A aplicação do mancozebe induziu ao aumento na atividade da CAT, porém quando aplicado com o Fox Xpro[®] a atividade foi diminuída.

Figura 11 - Atividade de enzimas Ascorbato Peroxidase (A) e Catalase (B) de plantas submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold®, e bioestimulante Foltron Plus®.



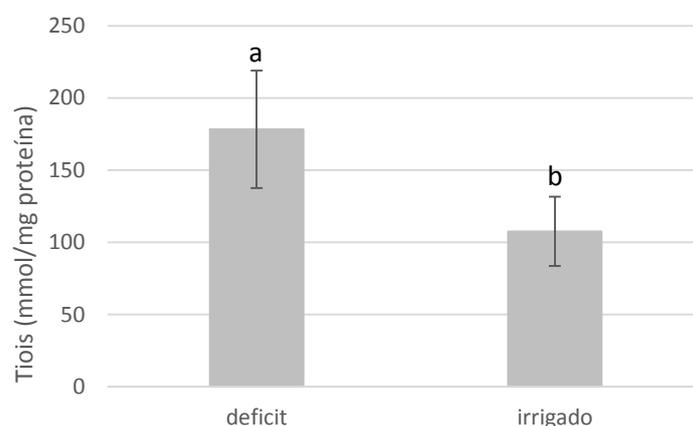
Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

A literatura indica a possível relação do mancozebe e sua composição (2% de Zinco e 18% de Manganês) à atividade de enzimas antioxidantes. A enzima superóxido dismutase possui diferentes isoformas, sendo o cofator metálico dessas o responsável por diferenciar cada uma delas. Um deles é composto por cobre e zinco como o Unizeb Gold® possui zinco como constituinte era esperado que a aplicação deste fungicida

estimulasse a produção e atividade da enzima. No entanto, neste estudo a atividade da SOD não variou frente a aplicação dos diferentes xenobióticos e nem em diferentes condições de disponibilidade de água.

O conteúdo de tiois não proteicos, que representam o grupamento SH, e medem indiretamente a concentração de glutathiona, também não variou entre os diferentes tratamentos xenobióticos. Ao comparar plantas irrigadas e sob déficit hídrico, é possível verificar o aumento de tiois no tratamento de déficit hídrico (Figura 12), indicando a importância desse composto antioxidante na proteção da planta frente à uma condição de estresse oxidativo, desencadeada pelo estresse de falta de água.

Figura 12 - Conteúdo de tiois de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos e bioestimulante.

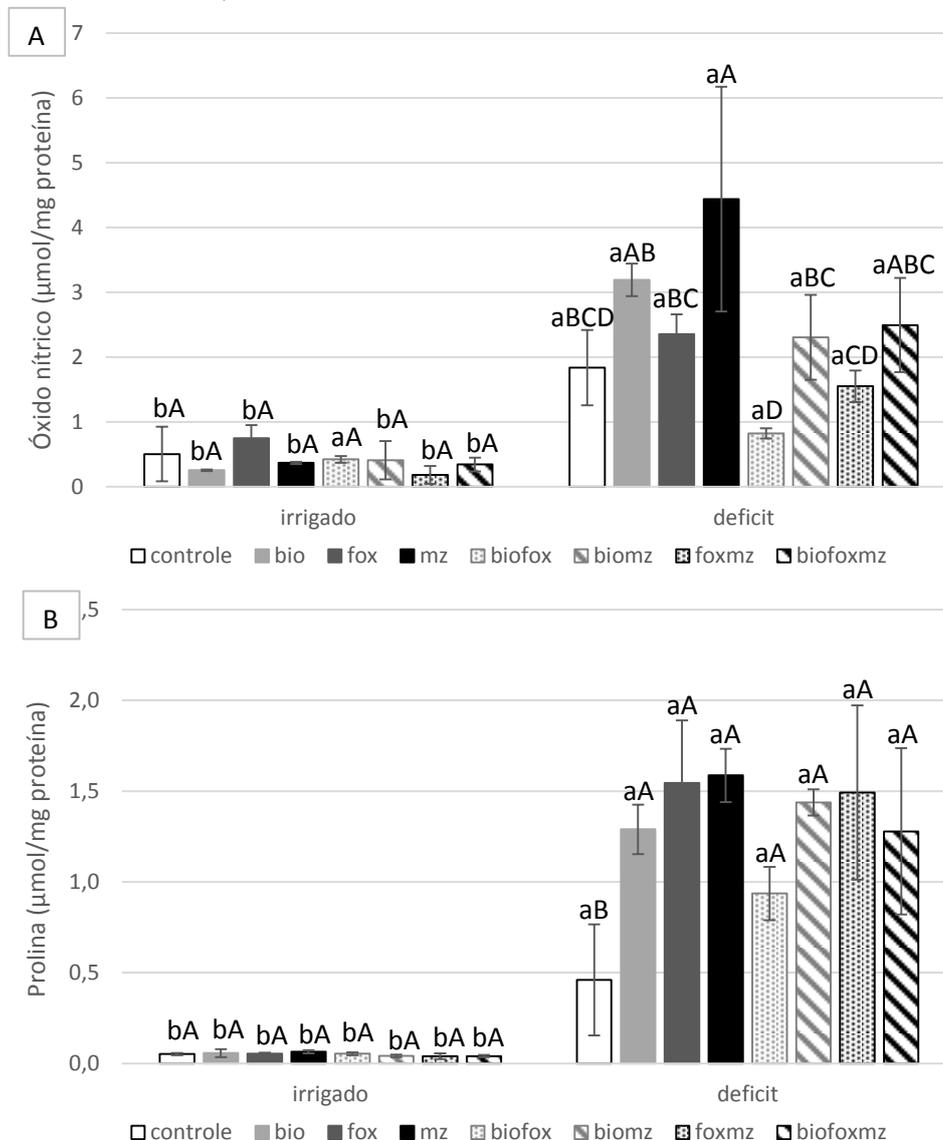


Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

5.4.6 Nitrito e prolina

O óxido nítrico também aumentou sua concentração nas células de plantas expostas à uma condição de falta de água, com exceção do tratamento de aplicação simultânea de Fox Xpro® e bioestimulante Foltron Plus® (Figura 13A). O maior percentual de aumento observado foi no tratamento com Unizeb Gold®, sendo esse maior de 90%. Na condição irrigada, o conteúdo de óxido nítrico não variou entre as plantas dos diferentes tratamentos.

Figura 13 - Conteúdo de nitrito (A) e prolina (B) de plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold®, e bioestimulante Foltron Plus®.



Nota: bio – bioestimulante; mz – Unizeb Gold. Letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos irrigado e déficit hídrico, e letras maiúsculas iguais não diferem entre os tratamentos químicos, de fungicida e bioestimulante pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o \pm desvio padrão das amostras.

O aumento no conteúdo de óxido nítrico pode estar relacionado com o aumento de EROs em plantas sob condição estressante, pois o óxido nítrico atua na desintoxicação de EROs e na defesa contra danos oxidativos (KANUNGO; JOSHI, 2014; PARANKUSAM et al., 2017). O aumento na concentração de óxido nítrico sob condições de estresse também pode representar uma sinalização das plantas, visto que

esse composto atua como mensageiro de processos biológicos (GROB; DURNER; GAUPELS, 2013; HE et al., 2019). Outros autores já haviam observado indução da formação de óxido nítrico com a aplicação de fungicidas (VENANCIO et al., 2003).

O conteúdo de prolina aumentou em todos os tratamentos na condição de déficit hídrico, sendo que os menores percentuais de aumento foram para o tratamento controle e para a aplicação de bioestimulante Foltron Plus[®] combinado com Fox Xpro[®] (Figura 13B).

Vários autores têm relatado o aumento nos níveis de prolina em condições de déficit hídrico (ALAM et al., 2010; SHEN et al., 2010; HAO et al., 2013; DEVI; GIRIDHAR, 2015; SUN et al., 2020). Isso ocorre pois a prolina é um osmorregulador, responsável pelo ajuste osmótico, por manter o turgor das células e proteger contra danos causados pelas EROs, mantendo assim a integridade das membranas (KIDO et al., 2013; IQBAL et al., 2014; KHAN et al., 2015; REDDY et al., 2015; SINGH et al., 2015; BLUM, 2017; ZHANG et al., 2017; DONG et al., 2019; MASOULEH; ALDINE; SASSINE, 2019).

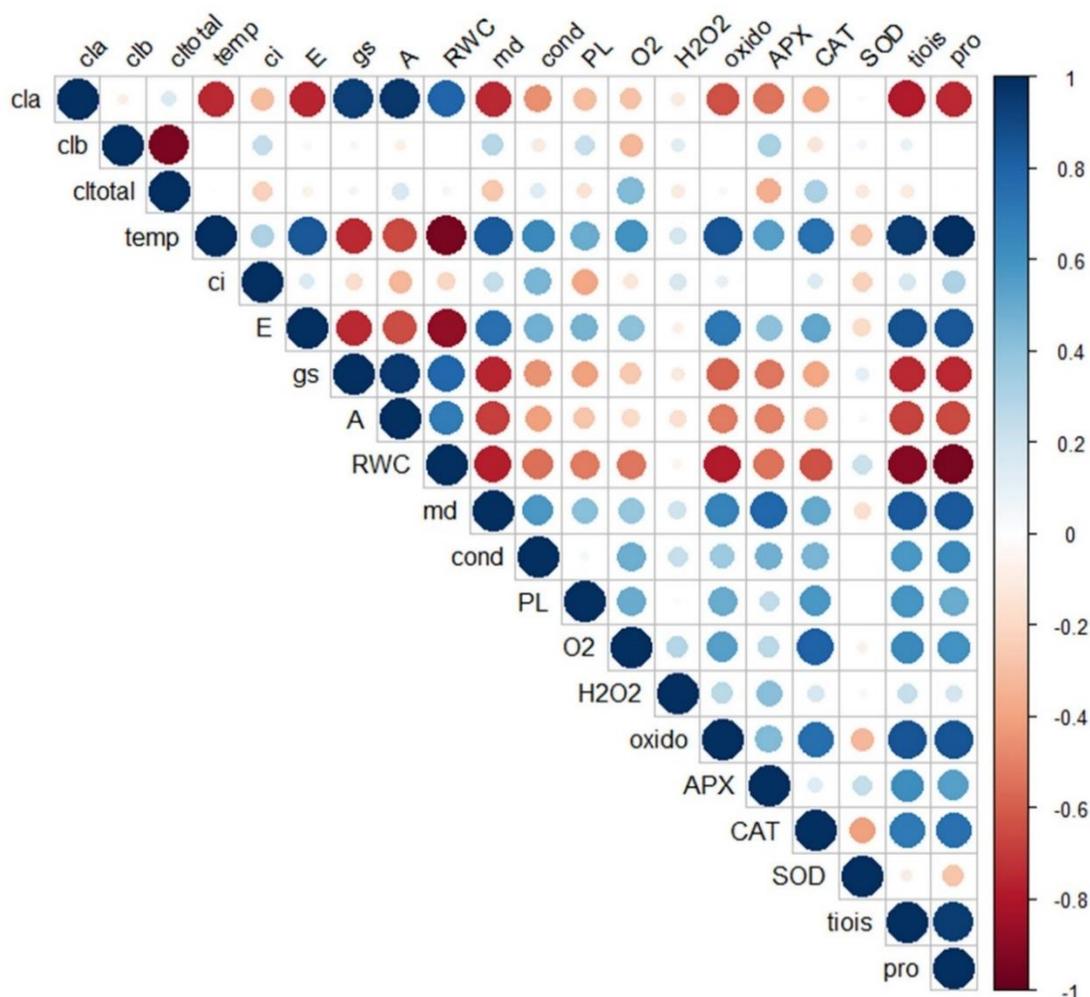
É importante observar ainda que enzimas são proteínas e que proteínas são formadas por aminoácidos e, portanto, o aminoácido folcisteína presente no Foltron Plus[®] e a prolina, aminoácido induzido pelo déficit hídrico, podem contribuir para a produção de enzimas que auxiliam nas defesas das plantas.

5.4.7 Correlações

Todas as variáveis analisadas foram correlacionadas e verificadas as associações entre elas a partir do método de Pearson (1920). Na matriz de correlação, esse grau pode ser observado pela cor e tamanho do círculo (Figura 14). Quanto maior o círculo e mais forte a cor maior o grau de associação, sendo azul associação positiva e vermelho associação negativa.

As correlações positivas mais fortes foram encontradas entre a condutância estomática e a fotossíntese com a clorofila *a*, e o conteúdo de tiois não proteicos e prolina com a temperatura foliar. Enquanto que as correlações negativas foram entre a temperatura foliar, a transpiração, tiois não proteicos e prolina com o conteúdo relativo de água. Maior condutância estomática representa maiores trocas gasosas, planta absorvendo radiação solar e CO₂, liberando água e oxigênio, com maior eficiência fotossintética, e portanto plantas com maior clorofila.

Figura 14 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis avaliadas em plantas de soja submetidas a irrigação e déficit hídrico e aplicação de aplicação de xenobióticos, fungicidas Fox Xpro® e Unizeb Gold®, e bioestimulante Foltron Plus®.



Abreviações: cla – clorofila *a*, clb – clorofila *b*, cltotal – clorofila total, temp – temperatura da folha, ci – concentração interna de CO₂, E – transpiração, gs – condutância estomática, A – fotossíntese, RWC – conteúdo relativo de água, md – dano de membrana, cond – condutividade elétrica, PL – peroxidação lipídica, O₂ – superóxido, H₂O₂ – peróxido de hidrogênio, oxido – óxido nítrico, APX – ascorbato peroxidase, CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, tiois – tiois não proteicos, , pro – prolina.

Numa condição de estresse por falta de água ocorre redução no conteúdo de água das plantas, pois há uma maior transpiração de água, e a temperatura da planta se eleva com a falta de água para o arrefecimento.

Aumento na temperatura e diminuição do potencial hídrico levaram à alterações metabólicas e induziram a produção de prolina e glutatona nas células, para incrementar seu sistema antioxidante e enfrentar as condições adversas, evitando os danos celulares e oxidativos.

5.4.8 Análise multivariada de componentes principais

A análise multivariada de componentes principais foi realizada para cada tratamento, segregando dentro de cada um, irrigado e déficit hídrico. As contribuições representadas por cada variável foram estimadas em cada tratamento (Figura 1 - Apêndice V). Temperatura foliar teve a menor contribuição de todas as variáveis, tendo contribuição considerável apenas para Foltron Plus[®] + Unizeb Gold[®]. Superóxido contribuiu pouco nas diferenças dos tratamentos para controle, Fox Xpro[®], e Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®] + Foltron Plus[®].

Peróxido de hidrogênio e superóxido dismutase apresentaram pouca contribuição de maneira geral para todos os tratamentos. As outras enzimas antioxidantes também tiveram pouca contribuição em alguns casos específicos, como CAT para Fox Xpro[®] + Foltron Plus[®] e Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®] + Foltron Plus[®] e APX para Fox Xpro[®] + Foltron Plus[®] e Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®].

As variáveis mais responsáveis pelas variações entre os tratamentos dentro do controle são: fotossíntese, condutância estomática, concentração interna de CO₂, peroxidação lipídica e dano de membranas (Figura 15A). Nesse caso, o fator água está sendo avaliado isolado, pois é o tratamento testemunha, que não recebeu nenhuma aplicação de produto, potencial fonte de algum estresse. Assim, justifica-se que as variáveis que se destacaram são relacionadas às respostas fisiológicas pois são as primeiras alterações em resposta à condição de estresse.

No tratamento com a aplicação de Foltron Plus[®] (Figura 30B) e Fox Xpro[®] (Figura 30C), além das variáveis fisiológicas já mencionadas, verifica-se uma grande contribuição da APX, CAT, óxido nítrico, prolina, e superóxido, que estão associadas ao metabolismo antioxidante das plantas. Enquanto que para a aplicação de Unizeb Gold[®] ainda podem ser adicionadas na lista, o peróxido de hidrogênio, os tiois não proteicos, e a clorofila *a* e *b*.

Nas associações de bioestimulante e xenobióticos, temos como variáveis mais influentes as fisiológicas: conteúdo relativo de água, fotossíntese, condutância estomática e transpiração, que estão fortemente correlacionadas com o tratamento irrigado. Dentre as variáveis bioquímicas, a maior contribuição foi observada para prolina, tiois, óxido nítrico e peroxidação de lipídios, as quais se associaram ao déficit hídrico.

Assim, parece existir uma tendência de relação da resposta dos tiois não proteicos com o Unizeb Gold[®], e da prolina e óxido nítrico principalmente na interação de xenobióticos com o Foltron Plus[®]. Embora estrobilurinas possam induzir a formação de óxido nítrico (VENANCIO et al., 2003), isso não foi observado neste estudo, o que pode ser devido a interações dos outros componentes presentes no Fox Xpro[®], além da estrobilurina.

Ainda, destaca-se a contribuição da transpiração, mesmo relacionada com o tratamento irrigado, e a relação com a aplicação de Fox Xpro[®]. Parece existir maior contribuição dessa variável em todos os gráficos com o xenobióticos Fox Xpro[®]. Isso porque fungicidas como o Fox Xpro[®], que possuem em sua composição, estrobilurina podem favorecer a aceleração do metabolismo da planta, pois aumentam o período fotossintético das plantas (BERTELSEN; NEERGAARD; SMEDEGAARD-PETERSEN, 2001).

Esse efeito observado em plantas irrigadas é intensificado na falta de água, quando a planta tem que fechar estômatos para evitar a perda de água, a concentração interna de CO₂ aumenta, devido às menores trocas com o ambiente, e conseqüentemente aumenta a temperatura interna da planta, assim como resulta em excesso de energia, o

que intensifica a produção de EROs, às quais ocasionam danos. Esse aumento de temperatura interna altera a composição das membranas, e portanto o xenobiótico quando aplicado nessa folha terá uma ação mais agressiva, visto que é composto por triazol, que tem essa maior agressividade intrínseca na molécula, além do efeito do óleo. Então, essa afinidade por lipídios, nesse caso em que a planta já está com sua estrutura modificada, intensifica os danos. Podemos relacionar isso com situações de campo, onde se observa fitotoxidez causada por FoxXpro[®]. Se há esse efeito visual é porque a alteração metabólica já aconteceu. Isso se deve principalmente à aplicações em horários e condições ambientais inadequadas, de alta temperatura, e baixa umidade do ar, assim como com tecnologia de aplicação inapropriada, no que diz respeito à volume de calda e tamanho de gota.

A variância total explicada para o tratamento controle foi de 56,4% para o CP1, e 21,3% para o CP2, totalizando 77,7%, sendo as variáveis mais correlacionadas com o tratamento irrigado foram a fotossíntese, a condutância estomática, o conteúdo relativo de água e a clorofila *b*, variáveis essas presentes dentro da elipse. Para o tratamento de déficit hídrico, as principais respostas foram em função da clorofila *a*, atividade da APX e dano de membrana.

Para o tratamento do Foltron Plus[®], 79,6% foi explicada pela variância total, sendo 62,4% do CP1, e 17% do CP2. A elipse formada pelas variáveis que explicam a maior diferença do tratamento irrigado compõem a condutância estomática, a transpiração, a fotossíntese, o conteúdo relativo de água, a peroxidação lipídica, e a superóxido dismutase. Diferenças com relação ao déficit hídrico estão mais relacionadas à atividade das enzimas ascorbato peroxidase e catalase, do conteúdo de óxido nítrico, prolina, tiois não proteicos, superóxido e concentração interna de CO₂.

Os biplots com a projeção das variáveis dos tratamentos com xenobióticos Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®] ficaram mais concentrado nos eixos y, visto que 72,2% e 68,7% da variância total foi explicada pela CP1, para Fox Xpro[®] e Unizeb Gold[®], respectivamente. CP2 foi responsável por 12,5% e 17,5%, totalizando 84,7% e 86,2%, respectivamente. Mais correlacionadas com o déficit hídrico estão a condutividade

elétrica, a prolina, o óxido nítrico, os tiois, e a catalase. Em relação ao tratamento irrigado estão associados o conteúdo relativo de água, a fotossíntese, a transpiração e a clorofila.

Associados ao déficit hídrico estão o óxido nítrico, e a prolina, em todos os tratamentos com misturas, e atividade de CAT para Fox Xpro[®] + Unizeb Gold[®], e CAT e APX para Foltron Plus[®] + Unizeb Gold[®], indicando possível ativação de mecanismos de defesa; dano de membrana, para Foltron Plus[®] + Fox Xpro[®], e condutividade elétrica para Fox Xpro[®] + Foltron Plus[®] + Unizeb Gold[®], sugerindo maior incidência de danos oxidativos.

Pelo que foi exposto podemos perceber uma maior associação de respostas fisiológicas pela aplicação de produtos, fungicidas ou bioestimulante, numa condição de boa disponibilidade de água para as planta, como é o caso do tratamento irrigado. Alguns trabalhos tem demonstrado alterações no metabolismo fisiológico pela aplicação de fungicidas (VENANCIO et al., 2003; FAGAN et al., 2010; PETIT et al., 2012; GIULIANI et al., 2018; ZAMBIAZZI et al., 2018) e bioestimulantes (DURANGO et al., 2013; DU JARDIN, 2015; YAKHIN et al., 2017).

Já os tratamentos que envolveram aplicação de xenobióticos e bioestimulantes numa condição de estresse por déficit hídrico, tiveram uma maior correlação com o metabolismo antioxidante da planta, indicando que numa condição estressante, as respostas podem ser mais expressivas no que concerne essas situações. Há uma tendência que a aplicação de produtos bioestimulantes contribua para ativação do metabolismo antioxidante da planta, reduzindo assim a energia que seria demandada por ela, com um efeito mais rápido e efetivo, e assim reduzir danos oxidativos, permitindo que a planta consiga expressar seu potencial produtivo de forma mais eficiente.

5.5 Conclusões

Alterações fisiológicas são induzidas pela aplicação de fungicidas em plantas sob condições irrigadas. O aumento na transpiração, condutância estomática e fotossíntese

indica que esses produtos, além de serem aplicados com a finalidade de prevenção ou controle de alguma doença, aceleram o metabolismo com potencial de indução de defesas nas plantas.

No entanto, a aplicação desses xenobióticos numa condição de estresse por déficit hídrico pode, em alguns casos, levar à intensificação deste estresse. Isso ocorre porque além da planta estar tentando evitar a perda de água para manter a turgescência e seus processos vitais, ela metaboliza este composto, o que poderá resultar num custo metabólico envolvido.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na ausência de déficit hídrico a utilização do Fox Xpro[®] traz alterações fisiológicas mais pronunciadas, como transpiração, aumento de trocas gasosas e fotossíntese. Porém, plantas tratadas com Fox Xpro[®] têm a atividade da APX aumentada em situações de déficit hídrico.

O uso de Unizeb Gold[®] aumenta a concentração do óxido nítrico e da catalase e reduz os danos em membranas. No entanto, não mitiga o estresse do Fox Xpro[®] como o bioestimulante Foltron Plus[®], o qual se destaca principalmente pela produção da prolina, óxido nítrico e por reduzir os danos oxidativos.

O uso combinado dos três compostos se deve pelo fato do Fox Xpro[®] ser indicado para o controle de doenças, o Unizeb Gold[®] para ampliar o espectro de ação e reduzir o risco de resistência e o bioestimulante Foltron Plus[®] para mitigar os danos causados pelos xenobióticos, principalmente em condições de déficit hídrico.

Este estudo destaca a importância de avaliar a fisiologia e a bioquímica das plantas em resposta à aplicação do bioestimulante, com foco em entender o mecanismo de ação desses produtos.

7 CONCLUSÃO GERAL

A combinação de déficit hídrico e xenobiótico desencadeia maior estresse oxidativo nas plantas de soja em comparação aos fatores isolados de estresse.

O bioestimulante à base de folcisteína contribui para a amenização dos danos oxidativos ocasionados pelo estresse.

O mancozebe induz a produção e atividade de compostos antioxidantes e sinalizadores, como prolina e óxido nítrico, no entanto sua ação é maior quando utilizado isolado.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, M.; SHARMA, S.; KAUR, N.; PATHANIA, D. Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 140, n. 3, p. 354-367, 2011.

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.

ALAM, I.; SHARMIN, S. A.; KIM, K-H.; YANG, J. K.; CHOI, M. S.; LEE, B-H. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. **Plant and Soil**, v. 333, p. 491-505, 2010.

ALVES, V. M.; JULIATTI, F. C. Fungicidas no manejo da ferrugem da soja, processos fisiológicos e produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 3, p. 245-251, 2018.

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.

AMIN, D.; JAMPALA, S. S. M. Evaluating the physiological effect of strobilurin based fungicide (Opera 183 g/L SE) against *Sclerotium rolfsii* and *Aspergillus niger* pathogens of *Arachis hypogaea* L. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, p. 485-504, 2018.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.

ASHRAF, M. A.; IQBAL, M.; RASHEED, R.; HUSSAIN, I.; PARVEEN, S.; MAHMOOD, S. **Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water-**

limited environments. In: Plant metabolites and regulation under environmental stress. Academic Press, 2018.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BALARDIN, R. S.; MADALOSSO, M. G.; STEFANELLO, M. T.; MARQUES, L. N.; DEBORTOLI, M. P. **Mancozebe: muito além de um fungicida.** 1. ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2017. 147 p.

BANDARA, A. Y.; WEERASOORIYA, D. K.; CONLEY, S. P.; BRADLEY, C. A.; ALLEN, T. W.; ESKER, P. D. Modeling the relationship between estimated fungicide use and disease-associated yield losses of soybean in the United States I: Foliar fungicides vs foliar diseases. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, e0234390, 2020.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BATES, L. S., WALDREN, R. P, TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for 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.

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

BENEKOS, K.; KISSOUDIS, C.; NIANIOU-OBEIDAT, I.; LABROU, N.; MADESIS, P.; KALAMAKI, M.; MAKKRIS, A.; TSAFTARIS, A. Overexpression of a specific soybean *GmGSTU4* isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 195-201, 2010.

BERGER-NETO, A.; JACCOUD-FILHO, D. S.; WUTZKI, C. R.; TULIO, C. E.; PIERRE, M. L. C.; MANFRON, F.; JUSTINO, A. Effect of spray droplet size, spray volume and fungicide on the control of white mold in soybeans. **Crop Protection**, v. 92, p. 190-197, 2017.

BERTELSEN, J. R.; NEEGARD, E. de.; SMEDEGAARD-PETERSEN. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. **Plant Pathology**, v. 50, p. 190-205, 2001.

BERWAL, M. K.; RAM, C. **Superoxide Dismutase: a stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants**. In: Oliveira, A, editor. Abiotic and biotic stress in plants. London: IntechOpen; 2019, 162 p.

BHAVANI, P.; PARAMESWARI, E.; MAHESWARI, M. Impacts of xenobiotic compounds on the environment. **Biotica Research Today**, v. 3, n. 11, p. 1011-1013, 2021.

BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell and Environment**, v. 40, p. 4-10, 2017.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMATO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole, 2003. 550 p.

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.

BROWN, P.; SAA, S. Biostimulants in agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 671, 2015.

BUEZO, J.; SANZ-SAEZ, Á.; MORAN, J. F.; SOBA, D.; ARANJUELO, I.; ESTEBAN, R. Drought tolerance response of high-yielding soybean varieties to mild drought: physiological and photochemical adjustments. **Physiologia Plantarum**, v. 166: p. 88-104, 2019.

BULGARI, R.; COCETTA, G.; TRIVELLINI, A.; VERNIERI, P.; FERRANTE, A. Biostimulants and crop responses: a review. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2014.

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.

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.a

CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. **Genetic Molecular Biology**, v. 39, p. 1-6, 2016.b

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.

CHAKI, M.; BEGARA-MORALES, J. C.; BARROSO, J. B. Oxidative stress in plants. **Antioxidants**, n. 9, 481, 2020.

CHAVARRIA, G.; SCHNEIDER, J. R.; MÜLLER, M. A atenuação de estresses com bioestimulantes é relevante? **Informações Agronômicas**, n. 9, p. 25-29, 2021.

CECHIN, I.; CARDOSO, G. S.; FUMIS, T. F.; CORNIANI, N. Nitric oxide reduces oxidative damage induced by water stress in sunflower plants. **Bragantia (Plant Protection)**, v. 74, n. 2, 2015.

CICERO, L. L.; MADEISIS, P.; TSAFTARIS, A.; PIERRO, A. R. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. **Phytochemistry**, v. 116, p. 69-77, 2015.

COSTA, R. V.; COTA, L. V. **Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação**. Circular Técnica Embrapa n° 125, 2009.

DELANEY, M.; ARCHMILLER, A. A.; DELANEY, D. P.; WILSON, A. E.; SIKORA, E. J. Effectiveness of fungicide on soybean rust in the southeastern United States: A meta-analysis. **Sustainability**, v. 10, 1784, 2018.

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. 1, p. 148-151, 2014.

DONG, S.; JIANG, Y.; DONG, Y.; WANG, L.; WANG, W.; MA, Z.; YAN, C.; MA, C.; LIU, L. A study on soybean responses to drought stress and rehydration. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 8, p. 2006-2017, 2019.

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

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.

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.

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.

FANJUL-BOLADO, P.; FOGEL, R.; LIMSON, J.; PURCAREA, C.; VASILESCU, A. Advances in the detection of dithiocarbamate fungicides: Opportunities for biosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 12, 2021.

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).

FERREIRA, L. C.; CATANEO, A. C.; REMAHE, L. M. R.; BÚFALO, J.; SCAVRONI, J.; ANDRÉO-SOUZA, Y.; CECHIN, I.; SOARES, B. J. A. Morphological and physiological alterations induced by lactofen in soybean leaves are reduced with nitric. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 837-847, 2011.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. "ExpDes: Experimental Designs." <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/index.html>. 2014.

FIGUEIREDO, G. V. C.; FANTIN, L. H.; CANTERI, M. G.; ROCHA, J. C. F.; JACCOUD FILHO, D. S. A bayesian probability model can simulate the knowledge of soybean rust researchers to optimize the application of fungicides. **International Journal of Agricultural and Environmental Information Systems**, v. 10, n. 4, p. 37-51, 2019.

FORSTER, W. A.; ZABKIEWICZ, J. A.; RIEDERER, M. Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. **Pesticide Management Science**, v. 60, p.1105-1113, 2004.

FORSTER, W. A. **Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants**. 2006. 167 f. Dissertação - Universität Würzburg, Würzburg, 2006.

FOX, J.; WEISBERG, S. Using car and effects functions in other functions. **Using car and effects functions in other functions**, v. 3, 2020.

FRASCA, L. L. M. **Bioestimulantes no crescimento e desempenho agrônômico do feijão-comum de ciclo superprecoce**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

GALVÃO, R. F.; ECCO, M.; RIFFEL, R. C.; BARBOSA, A. P. Uso de diferentes adjuvantes na aplicação de fungicida na cultura da soja. **Research, Society and Development**, v.10, n. 10, e123101018469, 2021.

GARCIA, L. C.; MARTINS, M. A.; FRARE, I. C.; MELO, M. H.; MIGLIORINI NETO, E.; ZARDO FILHO, R.; WEIRICH NETO, P. H.; ROCHA, C. H.; GOMES, J. A.; SOUZA, N. M. Efficiency of soybean crop fungicide spray applications at timed intervals based on a calendar schedule versus agrometeorological data. **Crop Protection**, v. 132, 105-128, 2020.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v. 143, 8e96, 2009.

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.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; ANDRADE Jr., E. R.; SIQUERI, F. V. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Circular Técnica Embrapa nº 119, 2016.

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

GROB, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 419, 2013.

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.

GUO, Y. Y.; TIAN, S. S.; LIU, S. S.; WANG, W. Q.; SUI, N. Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. **Photosynthetica**, v. 56, p. 861-872, 2018.

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.; BHUYAN, M.H.M.B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S.M.; MAHMUD, J.A.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, 681, 2020.

HASANUZZAMAN, M.; PARVIN, K.; BARDHAN, K.; NAHAR, K.; ANEE, T.I.; MASUD, A.A.C.; FOTOPOULOS, V. Biostimulants for the regulation of reactive oxygen species metabolism in plants under abiotic stress. **Cells**, v. 10, 2537, 2021. a

HASANUZZAMAN, M.; INAFUKU, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M.; OKU, H. Nitric oxide regulates plant growth, physiology, antioxidant defense, and ion homeostasis to confer salt tolerance in the mangrove species, *Kandelia obovata*. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, 611, 2021. b

HE, H.; OO, T. L.; HUANG, W.; HE, L-F.; GU, M. Nitric oxide acts as an antioxidant and inhibits programmed cell death induced by aluminum in the root tips of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Scientific Reports**, v. 9, 9516, 2019.

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.

IQBAL, N.; UMAR, S.; KHAN, N. A.; KHAN, M. I. R. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 34-42, 2014.

IQBAL, N.; HUSSAIN, S.; ZHANG, X-W; YANG, C-Q; RAZA, M; DENG, J-C; AHMAD, S; ASHGAR, M; ZHANG, J; YANG, W; LIU, J. Imbalance water deficit improves the seed yield and quality of soybean. **Agronomy Journal**, v. 8, n. 9, article168, 2018.

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.

IZQUIERDO, J.; PINTOS, G. G. Multiyear study on the yield of soybean as affected by humic biostimulation at Uruguay. **Research Journal of Agronomy**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2021.

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.

JULIÃO, E. C.; SANTANA, M. D.; FREITAS-LOPES, R. L.; VIEIRA, A. P.; CARVALHO, J. S. B.; LOPES, U. P. Reduction of brown leaf spot and changes in the chlorophyll a content induced by fungicides in cassava plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p. 433-439, 2020.

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, p.37-50, 2018.

KANUNGO, M.; GURUPRASAD, K. N.; KATARIA, S.; DUDIN, G. A.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Foliar application of fungicide-opera alleviates negative impact of water stress in soybean plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 2626-2633, 2021.

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

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. **R package version 1.0.7. 2020**. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>

KHAN, M. S.; 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 Science**, v. 3, n. 5, p. 272–278, 2015.

KIDO, E. A.; FERREIRA NETO, J. R. C.; SILVA, R. L. O.; BELARMINO, L. C.; BEZERRA NETO, J. P.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; PANDOLFI, V.; SILVA, M. D.; NEPOMUCENO, A. L.; BENKO-ISEPPON, A. M. Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: Identifying important components to face abiotic stress. **BMC Bioinformatics**, v. 14 (SUPPL.1), p. 1–11, 2013.

KNEBEL, D. F.; SILVA, D. R. O.; DEMARI, G. H.; CARVALHO, I. R.; SZARESKI, V. J.; SANTOS, L. A.; PELEGRIN, A. J.; MURARO, D. S.; BARBOSA, M. H.; SILVA, A. D. B.; LAUTENCHLEGER, F.; PIMENTEL, J. R.; TROYJACK, C.; VILLELA, F. A.; SOUZA, V. Q. Economic efficiency and soybean yield due to the use of different fungicide combinations. **Plant Omics Journal**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2019.

KOSAR, F.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; AHMAD, A.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Impact of exogenously applied trehalose on leaf biochemistry, achene yield and oil composition of sunflower under drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 172, p. 317-333, 2021.

LABUDDA, M.; AZAM, F. M. S. Glutathione-dependent responses of plants to drought: a review. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 83, n. 1, p. 3-12, 2014.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2000. 550p.

LANGENBACH, C.; CAMPE, R.; BEYER, S. F.; MUELLER, A. N.; CONRATH, U. Fighting asian soybean rust. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 797, 2016.

LEE, J.; TATSUMI, A.; TSUKAKOSHI, K.; WILSON, E. D.; ABE, K.; SODE, K.; IKEBUKURO, K. Application of a glucose dehydrogenase-fused with zinc finger

protein to label DNA aptamers for the electrochemical detection of VEGF. **Sensors**, v. 20, n. 14, 3878, 2020.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, 2008.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. 2 ed. New York: Academic Press, 1980. 256 p.

LICHTENTHALER, H. K. The stress concept in plants: an introduction. **Annals New York Academy of Science**, v. 30, n. 851, p. 187-198, 1998.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v. 364, p. 626-632, 1993.

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.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2020. Acesso em: 24 mai 2021. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/pib-do-setor-agropecuaria-apresentou-crescimento-de-2-em-2020>

MARQUES, L. N. **Mancozebe associado ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi* × *Glycine max*: respostas fisiológicas das plantas**. 2017. 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

MARTIN-StPAUL, N.; DELZON, S.; COCHARD, H. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. **Ecology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1437-1447, 2017.

MASOULEH, S. S. S.; ALDINE, N. J.; SASSINE, Y. N. The role of organic solutes in the osmotic adjustment of chilling-stressed plants (vegetable, ornamental and crop plants). **Ornamental agriculture**, v. 25, n. 4, p. 434-442, 2019.

MEENA, M.; DIVYANSHU, K.; KUMAR, S.; SWAPNIL, P.; ZEHRA, A.; SHUKLA, V.; YADAV, M.; UPADHYAY, R.S. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. **Heliyon**, v.5, article e02952.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

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

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

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

MOLINA, J. P. E.; PAUL, P. A.; AMORIM, L.; SILVA, L. H. C. P.; SIQUERI, F. V.; BORGES, E. P.; CAMPOS, H. D.; NUNES Jr., J.; MEYER, M. C.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; CARLIN, V. J.; GRIGOLLI, J. F. J.; BELUFFI, L. M. R.; GODOY, C. V. Meta-analysis of fungicide efficacy on soybean target spot and cost-benefit assessment. **Plant pathology**, v. 68, p. 94-106, 2019.

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.

MOSA KAREEM, A.; EL-NAGGAR MOHAMED, KALIDOSS, R.; HUSSAIN, A.; ATTIAT, E.; SYLVIE, W.; EMY, I.; HALA, H. Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Frontiers in Plant Science**, v 9, 872, 2018.

NABI, R. B. S.; TAYADE, R.; HUSSAIN, A.; KULKARNI, K. P.; IMRAN, Q. M.; MUN, B-G.; YUN, B-W. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and

heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 120-133, 2019.

NASCIMENTO, J. M. do.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; ZUNTINI, B.; MENDES, M. P.; LEONEL, R. K.; PONTIM, B. C. A. Associação de adjuvantes à picoxistrobina + ciproconazol no controle da ferrugem asiática da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 204-210, 2012.

NASCIMENTO, J. M. do.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; ZUNTINI, B.; MELO, E. P.; LEONEL, R. K. Número de aplicações e uso de adjuvantes, adicionados a fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Revista Agrarian**, v. 11, n. 40, p. 95-104, 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.

NETTO, A.; SACON, D.; GALLINA, A.; FOCESATTO, M.; STEFANSKI, F. S.; MILANESI, P. M. Use of systemic fungicides combined with multisite to control of asian rust and soybean yield. **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 1, p. 101-108, 2020.

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.

OULD SAID, C.; BOULAHIA, K.; EID, M. A. M.; RADY, M. M.; DJEBBAR, R.; ABROUS-BELBACHIR, O. Exogenously used proline offers potent antioxidative and osmoprotective strategies to re-balance growth and physio-biochemical attributes in herbicide-stressed *Trigonella foenum-graecum*. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 3254-3268, 2021.

PANDEY, P.; IRULAPPAN, V.; BAGAVATHIANNAN, M. V.; SENTHIL-KUMAR, M. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 537, 2017.

PANDEY, P.; RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations:

physiological and molecular mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 723, 2015.

PARANKUSAM, S.; ADIMULAM, S. S.; BHATNAGAR-MATHUR, P; SHARMA, K. K. Nitric oxide (NO) in plant heat stress tolerance: current knowledge and perspectives. **Frontiers in Plant Sciences**, v. 8, 1582, 2017.

PAULA, B. S.; FELTRIM, D.; ENGEL, D. C. H.; BAPTISTELLA, J. L. C.; RODRIGUES, M.; ENGEL, E.; MAZZAFERA, P. Algae-based biostimulants increase yield and quality of mini tomatoes under protected cultivation. **JSFA Reports**, p. 1-6, 2022.

PEARSON, K. Notes on the History of Correlation. **Biometrika**, v. 13, n. 1, p. 25-45, 1920.

PER, T. S.; KHAN, N. A.; REDDY, P. S.; MASOOD, A.; HASANUZZAMAN, M.; KHAN, M. I. R.; ANJUM, N. A. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126-140, 2017.

PEREIRA, S. I.; FIGUEIREDO, P. I.; BARROS, A. S.; DIAS, M. C.; SANTOS, C.; DUARTE, I. F.; GIL, A. M. Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. **Food Chemistry**, v. 154, p. 291-298, 2014.

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.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 69, 2015.

POSMYK, M. M.; SZAFRANSKA, K. Biostimulators: A New trend towards solving an old problem. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 748, 2016.

QUEIROZ, A. A.; MARTINS, J. A. S.; CUNHA, J. P. R. da. Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 8-19, 2008.

RAMAKRISHNA, W.; KUMARI, A. **Plant tolerance to combined stress: An overview**. In: Plant Tolerance to Individual and Concurrent Stresses, Springer (India), M Senthil-Kumar (ed.), p. 83-90, 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019.

REDDY, P. S.; JOGESWAR, G.; RASINENI, G. K.; MAHESWARI, M.; REDDY, A. R.; VARSHNEY, R. K.; KAVI KISHOR, P. B. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 104-113, 2015.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas**. 9. ed. Passo Fundo: Berthier, 2021. 287 p.

REIS, E. M.; ZANATTA, M.; REIS, A. C. Performance of prothioconazole solo or added to mancozeb in the control of Asian soybean rust. **Summa Phytopathology**, v. 46, n. 4, p. 345-347, 2020.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, 278e284, 2014.

RIOS, V. S.; RIOS, J. A.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; SILVEIRA, P. R.; BARROS, A. V.; RODRIGUES, F. A. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in soybean leaves infected by *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, p. 1-11, 2017.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: From experimental data to practical applications. **Agronomy**, 10, 1461, 2020.

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.

SANTA-CRUZ, D. M.; PACIENZA, N. A.; ZILLI, C. G.; TOMARO, M. L.; BALESTRASSE, K. B.; YANNARELLI, G. G. Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidant enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 202-209, 2014.

SANTOS, V. M.; MELO, A. V.; CARDOSO, D. P.; GONÇALVES, A. H.; SOUSA, D. C. V.; SILVA, A. R. Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de soja. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.12, n. 3, p. 512-517, 2017.

SATCHIVI, N. M.; STOLLER, E. W.; WAX, L. M.; BRISKIN, D. P. A Nonlinear dynamic simulation model for xenobiotic transport and whole plant allocation following foliar application. III. Influence of chemical properties, plant characteristics, and environmental parameters on xenobiotic absorption and translocation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, p. 77-87, 2001.

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.

SCHNEIDER, J. R.; MÜLLER, M.; KLEIN, V. A.; ROSSATO-GRANDO, L. G.; BARCELOS, R. P.; DALMAGO, G. A.; CHAVARRIA, G. Soybean plant metabolism under water deficit and xenobiotic and antioxidant agent application. **Biology**, v. 9, 266, 2020.

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.

SHABNAM, N.; TRIPATHI, I.; SHARMILA, P.; PARDHA-SARADHI, P. A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. **Protoplasma**, v. 253, p. 1577-1582, 2015.

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.; JHA, A. B.; DEBEY, R. M.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, ID 217037, 2012.

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.

SHUKLA, P. S.; MANTIN, E. G.; ADIL, M.; BAJPAI, S.; CRITCHLEY, A. T.; PRITHIVIRAJ, B. *Ascophyllum nodosum*-Based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, article, 655, 2019.

SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C.; REIS, E. M. Control of Asian soybean rust with mancozeb, a multi-site fungicide. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 64-67, 2015.

SILVA, T. S.; FONSECA, L. F.; YAMADA, J. K.; PONTES, N. C. Flutriafol and azoxystrobin: An efficient combination to control fungal leaf diseases in corn crops. **Crop Protection**, v. 140, 105394, 2021.

SINGH, A.; KUMAR, A.; YADAV, S.; SINGH, I. K. Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. **Plant Gene**, v. 18, 100173, 2019.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 3, p. 407-426, 2015.

SINGH, S. K.; RAJA, R. K. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, p. 40-50, 2011.

SLABBERT, M. M.; KRÜGER, G. H. J. Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 123-128, 2014.

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

STAIKOV, N. S.; ANGELOV, M.; PETROV, V.; MINKOV, P.; KANOJIA, A.; GUINAN, K. J.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R.; SUJEETH, N.; GECHEV, T. S. An

Ascophyllum nodosum-Derived biostimulant protects model and crop plants from oxidative stress. **Metabolites**, v. 11, n. 24, 2020.

STEFANELLO, M. T.; MARQUES, L. N.; PINTO, F. F.; RAMOS, J. P. de; CADORE, P. C.; BALARDIN, R. S. Dinâmica do controle químico de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja submetidas a diferentes regimes hídricos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-6, e0792014, 2016.

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, C.; CHEN, H. Y. H.; RUAN, H. Response of plants to water stress: A meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 1-8, 2020.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, p.32-43, 2014.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

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.

TAVANTI, T. R.; MELO, A. A. R.; MOREIRA, L. D. K.; SANCHEZ, D. E. J.; SILVA, R. S.; SILVA, R. M.; REIS, A. R. Micronutrient fertilization enhances ROS scavenging system for alleviation of abiotic stresses in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 160, p. 386-396, 2021.

TEIXEIRA, W. F.; SOARES, L. H.; FAGAN, E. B.; MELLO, S. C.; REICHARDT, K.; DOURADO-NETO, D. Amino acids as stress reducers in soybean plant growth under different water-deficit conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 905-919, 2020.

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.

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.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Conceitos e aplicações dos adjuvantes. **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

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.

WU, Y.; GONG, W.; YANG, W. Shade inhibits leaf size by controlling cell proliferation and enlargement in soybean. **Scientific Reports**, v. 7, 9259, 2017.

WU, Y.; GONG, W.; WANG, Y.; YONG, T.; YANG, F.; LIU, W.; WU, X.; DU, J.; SHU, K.; LIU, J.; LIU, C.; YANG, W. Leaf area and photosynthesis of newly emerged trifoliolate leaves are regulated by mature leaves in soybean. **Journal of Plant Research**, v. 131, p. 671-680, 2018.

WU, Z.; ZHANG, Y. Effects of exogenous auxin on physiological and biochemical characteristics of soybean under PEG simulated drought stress. **Hubei Agricultural Sciences**, v. 58, n. 6, p. 16-19, 2019.

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.

XING, X.; ZHOU, Q.; HING, H.; JIANG, H.; WANG, S. Early abscisic acid accumulation regulates ascorbate and glutathione metabolism in soybean leaves under progressive water stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 865-876, 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.

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.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **The Journal of Experimental Biology**, 208, p.2819-2830, 2005.

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. 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, M.; WANG, L.; ZHANG, K.; LIU, F.; WAN, Y. Drought-induced responses of organic osmolytes and proline metabolism during pre-flowering stage in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 10, p. 2197-2205, 2017.a

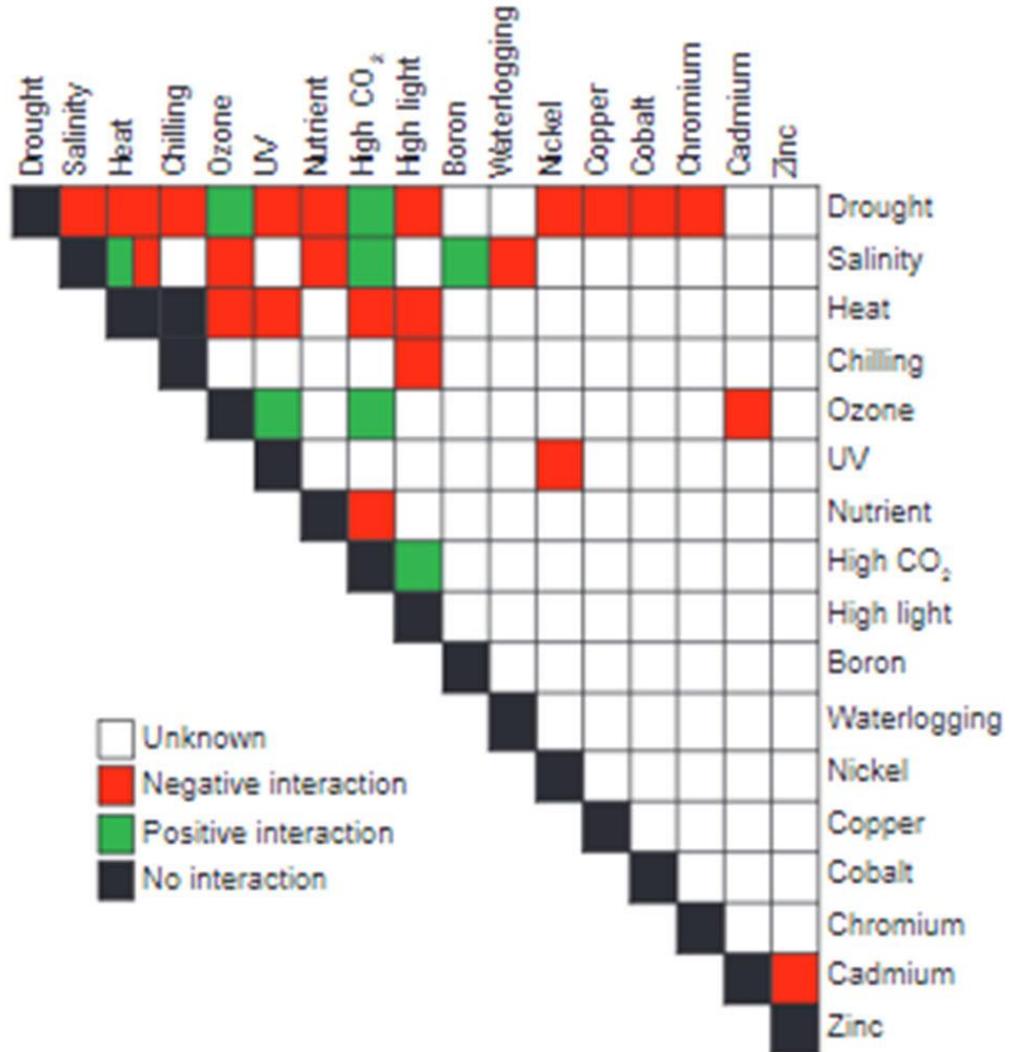
ZHANG, C.; LI, X.; HE, Y.; ZHANG, J.; YAN, T.; LIU, X. Physiological investigation of C4-phosphoenolpyruvate-carboxylase-introduced rice line shows that sucrose metabolism is involved in the improved drought tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 328–342, 2017.b

ZOTTINI, M.; FORMENTIN, E.; SCATTOLIN, M.; CARIMI, F.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. **FEBS Letters**, v. 515, p. 75-78, 2002.

ZULFIQAR, F.; CASADESÚS, A.; BROCKMAN, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Science*, v. 295, 110194, 2020.

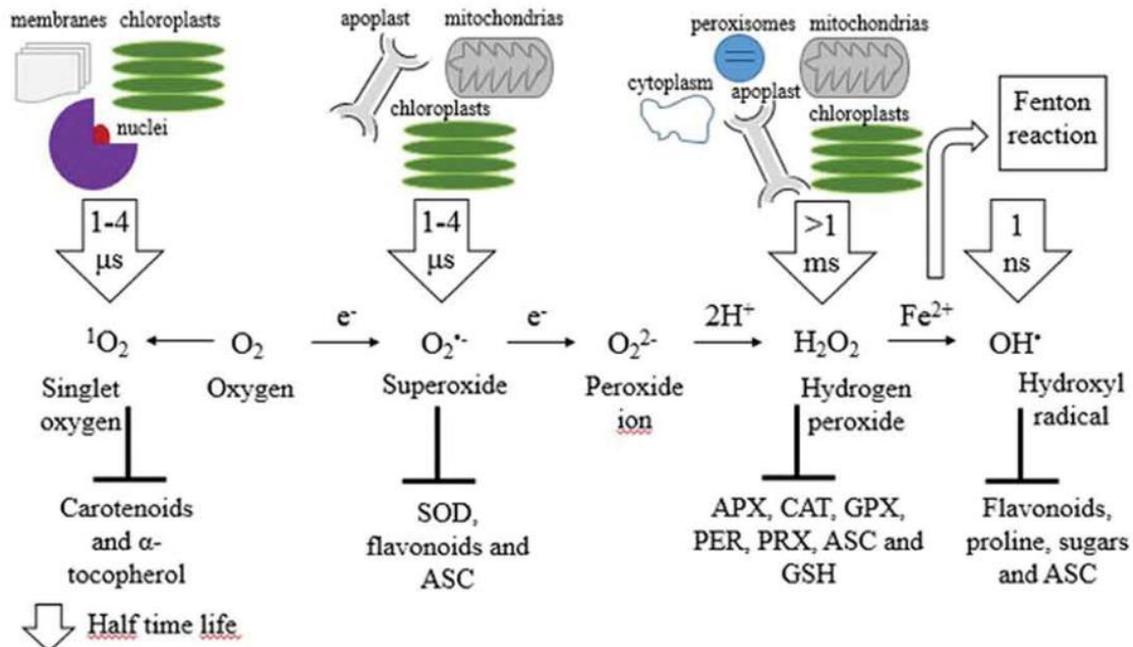
ANEXOS

Anexo I “Matriz de estresse” mostrando interação entre diferentes estresses, sendo positiva, negativa, sem interação ou desconhecida. Adaptada de Mittler (2006), modificada por Mittler e Blumwald (2010) e Suzuki et al. (2014).



Fonte: Zandalinas et al. (2018).

Anexo II Produção de espécies reativas de oxigênio por transferência de energia, incluindo os locais de produção e os principais sistemas de eliminação.



Fonte: Schneider et al. (2019).

Abbreviations: APX – ascorbate peroxidase; ASC – ascorbate; CAT – catalase; GPX – glutathione peroxidase; GSH – glutathione; PER – peroxidase; PRX – peroxiredoxin; SOD – superoxide dismutase.

APÊNDICES

Apêndice I Tabelas da análise de variância do experimento do capítulo I.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do experimento do capítulo I.

Fator de variação	Graus de liberdade	cla		clb		cltotal		ft	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	2,17	0,16 ^{ns}	4,99	0,52 ^{ns}	4,38	0,18 ^{ns}	82769	0,67 ^{ns}
agua (a)	1	0,05	0,81 ^{ns}	5,6	0,40 ^{ns}	0,23	0,74 ^{ns}	1	0,99 ^{ns}
produto (p)	1	3,73	0,08 ^{ns}	1,39	0,67 ^{ns}	11,32	0,05 ^{ns}	231019	0,32 ^{ns}
a x p	1	0,43	0,50 ^{ns}	4,26	0,46 ^{ns}	1,45	0,42 ^{ns}	18252	0,77 ^{ns}
resíduo	6	0,85		6,91		1,92		196050	
total	11								

Fator de variação	Graus de liberdade	qy		temp		rwc		cond	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,0001	0,10 ^{ns}	1,09	0,05 ^{ns}	73,9	0,15 ^{ns}	2,28	0,93 ^{ns}
agua (a)	1	0,000008	0,68 ^{ns}	0,18	0,39 ^{ns}	4129,6	0,00*	24,18	0,43 ^{ns}
produto (p)	1	0,000008	0,68 ^{ns}	2,93	0,01*	8,9	0,60 ^{ns}	2,28	0,80 ^{ns}
a x p	1	0,000008	0,68 ^{ns}	0,05	0,63 ^{ns}	2,5	0,78 ^{ns}	12,53	0,56 ^{ns}
resíduo	6	0,00004		0,21		28,9		33,6	
total	11								

Fator de variação	Graus de liberdade	dano		ce		mda		H ₂ O ₂ ◇	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	256,4	0,36 ^{ns}	3009	0,26 ^{ns}	34651	0,85 ^{ns}	0,004	0,87 ^{ns}
agua (a)	1	4156,3	0,00*	72075	0,00*	1688749	0,03*	0,222	0,04*
produto (p)	1	41,1	0,68 ^{ns}	5461	0,13 ^{ns}	264966	0,30 ^{ns}	0,013	0,55 ^{ns}
a x p	1	116,4	0,49 ^{ns}	8856	0,07 ^{ns}	284860	0,29 ^{ns}	0,013	0,53 ^{ns}
resíduo	6	212,9		1782		207945		0,031	
total	11								

Fator de variação	Graus de liberdade	O ₂ ^{•-}		tiois		on◇		pro	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	2962,1	0,28 ^{ns}	216	0,83 ^{ns}	0,18	0,23 ^{ns}	0,005	0,17 ^{ns}
agua (a)	1	8372	0,08 ^{ns}	36011	0,00*	0,74	0,03*	0,229	0,00*
produto (p)	1	5007,8	0,15 ^{ns}	251	0,66 ^{ns}	0,85	0,02*	0,008	0,11 ^{ns}
a x p	1	1963,8	0,34 ^{ns}	329	0,61 ^{ns}	0,99	0,02*	0,007	0,13 ^{ns}
resíduo	6	1845		1150		0,09		0,002	
total	11								

Fator de variação	Graus de liberdade	apx		cat		sod	
		QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,0004	0,96 ^{ns}	0,06	0,27 ^{ns}	275,24	0,67 ^{ns}
agua (a)	1	0,1902	0,01*	0,72	0,01*	168,04	0,63 ^{ns}
produto (p)	1	0,0355	0,13 ^{ns}	0,01	0,70 ^{ns}	168,94	0,63 ^{ns}
a x p	1	0,0141	0,31 ^{ns}	0,06	0,25 ^{ns}	190,86	0,61 ^{ns}
resíduo	6	0,0116		0,04		647,19	
total	11						

Nota: ◇ dados transformados; cla – clorofila *a*; clb – clorofila *b*; clt – clorofila total; ft – fluorescência total da clorofila; qy – rendimento quântico do fotossistema II; temp – temperatura da folha; rwc – conteúdo relativo de água; cond – condutância estomática; dano – dano de membrana; ce – condutividade elétrica; mda – peroxidação lipídica; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; O₂^{•-} - superóxido; tiois – tiois não-

proteicos; on – óxido nítrico; pro – prolina; apx – ascorbato peroxidase; cat – catalase; sod – superóxido dismutase.

Tabela 2 - Tabela do teste de normalidade dos resíduos e teste de homogeneidade das variâncias.

Variável	cla	clb	cltotal	ft	qy	temp	rwc	cond	dano	ce
CV (%)	3,29	25,90	3,71	10,30	0,81	2,07	8,74	26,81	38,32	29,94
Shapiro-wilk	0,59	0,20	0,59	0,67	0,71	0,64	0,61	0,45	0,89	0,05
Levene	0,42	0,84	0,63	0,69	0,96	0,68	0,67	0,26	0,52	0,42

Variável	mda	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	tiois	on	pro	apx	cat	sod
CV (%)	30,17	14,51	30,33	29,81	15,19	27,71	30,29	37,85	32,94
Shapiro-wilk	0,15	0,17	0,80	0,33	0,05	0,19	0,48	0,26	0,13
Levene	0,94	0,96	0,58	0,39	0,16	0,34	0,92	0,71	0,71

Nota: CV – coeficiente de variação; cla – clorofila *a*; clb – clorofila *b*; clt – clorofila total; ft – fluorescência total da clorofila; qy – rendimento quântico do fotossistema II; temp – temperatura da folha; rwc – conteúdo relativo de água; cond – condutância estomática; dano – dano de membrana; ce – condutividade elétrica; mda – peroxidação lipídica; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; O₂⁻ - superóxido; tiois – tiois não-proteicos; on – óxido nítrico; pro – prolina; apx – ascorbato peroxidase; cat – catalase; sod – superóxido dismutase.

Apêndice II Tabelas da análise de variância dos experimentos do capítulo II.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos experimentos do capítulo II.

Fator de variação	Graus de liberdade	ON 2018-I		ON 2018-II		Pro 2018-I		Pro 2018-II	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,13	0,96 ^{ns}	2,26	0,79 ^{ns}	0,00	0,97 ^{ns}	0,73	0,54 ^{ns}
pot (p)	3	61,4	0,00**	319,6	0,00**	0,43	0,00**	40,81	0,00**
xeno (x)	3	10,4	0,06*	146,6	0,00**	0,00	0,72 ^{ns}	9,49	0,00**
p X x	9	3,45	0,53 ^{ns}	209,9	0,00**	0,00	0,94 ^{ns}	8,62	0,00**
resíduo	30	3,79		9,47		0,01		1,15	
total	47								

Nota: pot – potenciais de água do solo; xeno – xenobióticos; ON – óxido nítrico; Pro – prolina.

Tabela 4 - Tabela do teste de normalidade dos resíduos.

Variável	ON 2018-I	ON 2018-II	Pro 2018-I	Pro 2018-II
CV (%)	47,57	22,73	66,39	80,10
Shapiro-wilk	0,96	0,95	0,94	0,93

Apêndice III Tabelas da análise de variância do experimento do capítulo III

Tabela 5 - Resumo da análise de variância dos experimentos do capítulo III.

Fator de variação	Graus de liberdade	Tleaf Δ		ci		E \diamond		gs \diamond	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,07	0,88 ^{ns}	2507	0,44 ^{ns}	0,03	0,63 ^{ns}	1,21	0,26 ^{ns}
água (a)	1	0,15	0,59 ^{ns}	124110	0,00**	12,42	0,00**	160,56	0,00**
xeno (x)	7	0,83	0,17 ^{ns}	2859	0,49 ^{ns}	0,21	0,01**	7,08	0,00**
a X x	7	0,03	0,99 ^{ns}	1441	0,84 ^{ns}	0,16	0,02*	6,29	0,00**
resíduo	30	0,52		3016		0,06		0,85	
total	47								

Fator de variação	Graus de liberdade	A \diamond		Cla		C1b \diamond		C1total	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,04	0,63 ^{ns}	9,61	0,33 ^{ns}	0,03	0,41 ^{ns}	3,83	0,66 ^{ns}
água (a)	1	25,3	0,00**	38,8	0,04*	1,44	0,00**	0,54	0,81 ^{ns}
xeno (x)	7	0,79	0,00**	358	0,00**	3,13	0,00**	96,2	0,00**
a X x	7	0,26	0,01**	201	0,00**	2,43	0,00**	36,6	0,00**
resíduo	30	0,08		8,31		0,03		9,15	
total	47								

Fator de variação	Graus de liberdade	RWC		MD \diamond		cond		PL	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	112	0,09 ^{ns}	0,09	0,21 ^{ns}	827	0,32 ^{ns}	502851	0,27 ^{ns}
água (a)	1	22581	0,00**	8,67	0,00**	76640	0,00**	2318553	0,02*
xeno (x)	7	87,5	0,08 ^{ns}	0,15	0,03*	14815	0,00**	543473	0,22 ^{ns}
a X x	7	63,8	0,21 ^{ns}	0,22	0,00**	19955	0,00**	350016	0,49 ^{ns}
resíduo	30	42,8		0,06		701		371174	
total	47								

Fator de variação	Graus de liberdade	H ₂ O ₂		O ₂		ON \diamond		Pro \diamond	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	0,02	0,76 ^{ns}	5853	0,62 ^{ns}	0,03	0,48 ^{ns}	0,35	0,02**
água (a)	1	0,00	0,85 ^{ns}	106421	0,01**	9,44	0,00**	119,2	0,00**
xeno (x)	7	0,18	0,06 ^{ns}	26771	0,06 ^{ns}	0,21	0,00**	0,35	0,00**
a X x	7	0,28	0,01**	37254	0,01**	0,21	0,00**	0,41	0,00**
resíduo	30	0,08		12177		0,04		0,08	
total	47								

Fator de variação	Graus de liberdade	APX		CAT		SOD		tiois	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
bloco	2	4e-6	0,29 ^{ns}	0,00	0,98 ^{ns}	99,07	0,26 ^{ns}	4367	0,02**
água (a)	1	1e-4	0,00**	0,51	0,00**	88,78	0,27 ^{ns}	59758	0,00**
xeno (x)	7	1e-5	0,01**	0,05	0,00**	90,24	0,29 ^{ns}	930	0,51 ^{ns}
a X x	7	3e-5	0,00**	0,08	0,00**	67,87	0,47 ^{ns}	1034	0,44 ^{ns}
resíduo	30	3e-6		0,00		70,14		1013	
total	47								

Nota: Δ dados não normais; \diamond dados transformados; xeno – xenobióticos; Tleaf – temperatura foliar; ci – concentração interna de CO₂; E – transpiração; gs – condutância estomática; A – fotossíntese; Cla – clorofila *a*; C1b – clorofila *b*; C1total – clorofila total; RWC – conteúdo relativo de água; MD – dano de membrana; cond – condutividade elétrica; PL – peroxidação lipídica; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; O₂⁻ - superóxido; ON – óxido nítrico; Pro – prolina; APX – ascorbato peroxidase; CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase. tiois – tiois não-proteicos.

Tabela 6 - Tabela do teste de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias.

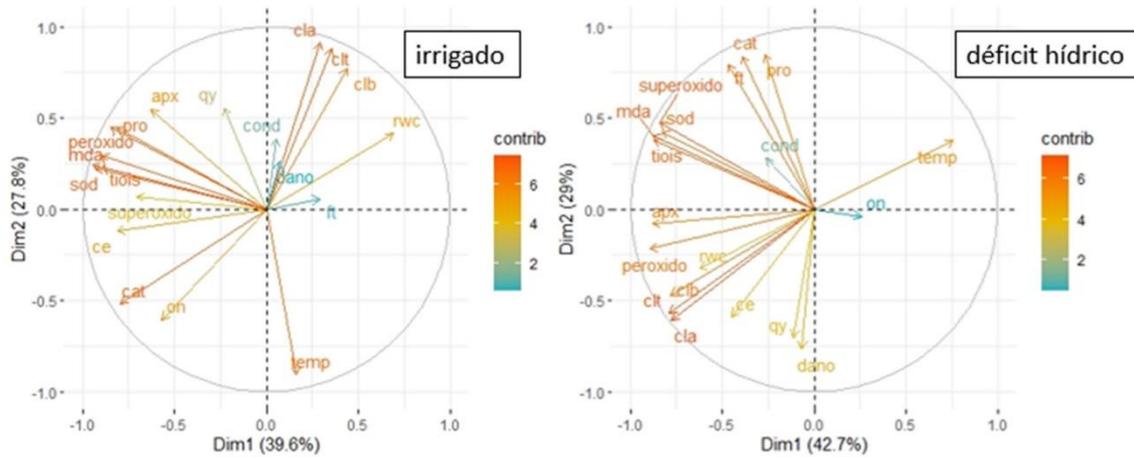
Variável	Tleaf	ci	E	gs	A	Cl _a	Cl _b	Cl _{total}	RWC	MD
CV (%)	2,37	15,67	59,07	15,55	17,9	7,45	6,52	6,49	8,98	8,94
Shapiro-wilk	0,00	0,84	0,26	0,09	0,54	0,36	0,29	0,30	0,12	0,28
Levene	0,71	0,92	0,84	0,46	0,64	0,42	0,55	0,81	0,58	0,78

Variável	cond	PL	H ₂ O ₂	O ₂	ON	Pro	APX	CAT	SOD	tiois
CV (%)	19,40	36,77	28,95	24,88	18,31	19,39	27,76	9,48	15,07	22,27
Shapiro-wilk	0,99	0,09	0,39	0,09	0,07	0,42	0,65	0,18	0,84	0,09
Levene	0,92	0,96	0,93	0,99	0,33	0,50	0,65	0,69	0,79	0,94

Nota: CV – coeficiente de variação; Tleaf – temperatura foliar; ci – concentração interna de CO₂; E – transpiração; gs – condutância estomática; A – fotossíntese; Cl_a – clorofila *a*; Cl_b – clorofila *b*; Cl_{total} – clorofila total; RWC – conteúdo relativo de água; MD – dano de membrana; cond – condutividade elétrica; PL – peroxidação lipídica; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; O₂^{*} - superóxido; ON – óxido nítrico; Pro – prolina; APX – ascorbato peroxidase; CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase. tiois – tiois não-proteicos.

Apêndice IV Biplot das contribuições das variáveis na variância total explicada pela
ACP do capítulo I.

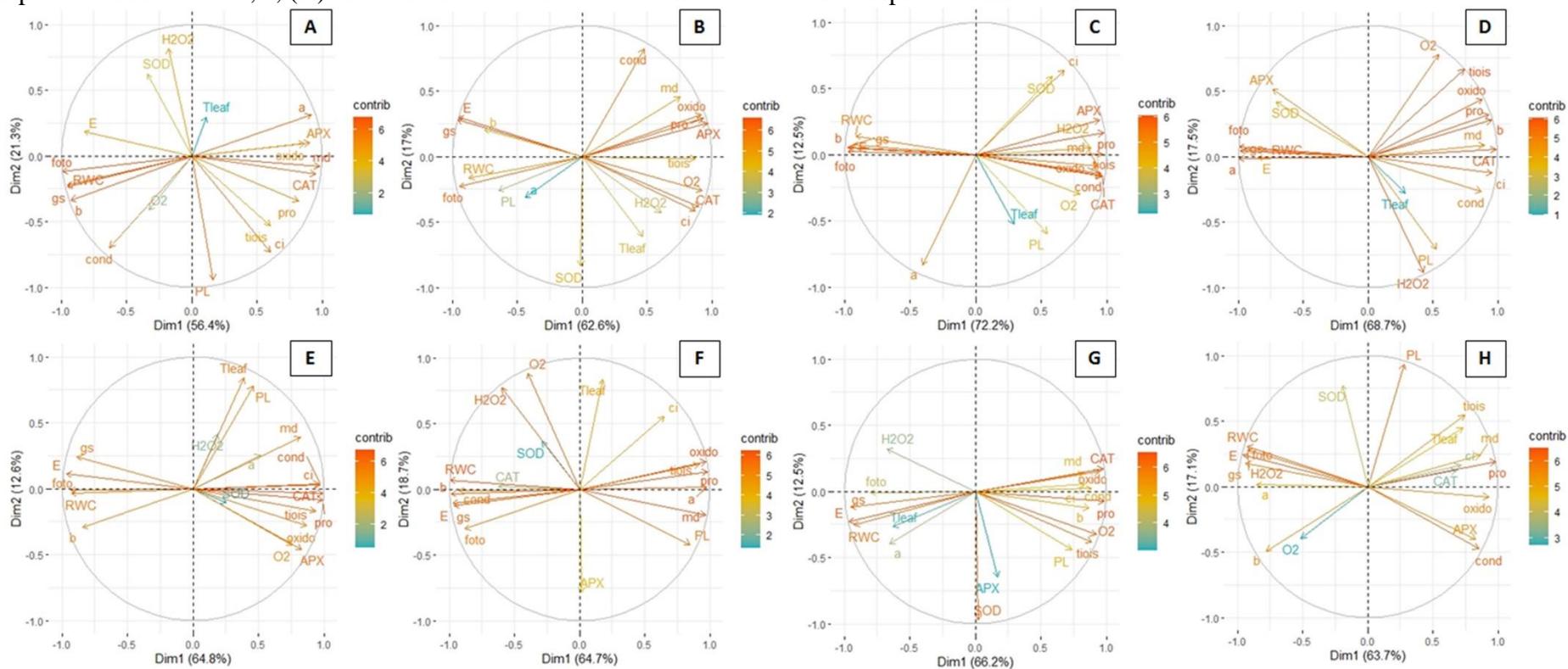
Figura 1 - Biplot com a contribuição das variáveis na variância total explicada pela análise de componentes principais para os tratamentos irrigado e déficit hídrico, com e sem mancozebe.



Abreviações: cla – clorofila **a**, clb – clorofila **b**, clt – clorofila total, temp – temperatura da folha, cond – condutância estomática, rwc – conteúdo relativo de água, ft – fluorescência total, qy – rendimento quântico do FSII, dano – dano de membrana, ce – condutividade elétrica, mda – peroxidação lipídica, peróxido – peróxido de hidrogênio, superóxido – superóxido, apx – ascorbato peroxidase, cat – catalase, sod – superóxido dismutase, tiois – tiois não proteicos, on – óxido nítrico, pro – prolina.

Apêndice V Biplot contribuições das variáveis na variância total explicada pela ACP do capítulo III.

Figura 2 - Biplot com a contribuição das variáveis na variância total explicada pela análise de componentes principais nas condições irrigado e déficit hídrico, para os tratamentos (A) controle, (B) bioestimulante Foltron Plus®, (C) xenobiótico Fox Xpro®, (D) xenobiótico Unizeb Gold®, (E) bioestimulante Foltron Plus® + xenobiótico Unizeb Gold®, (F) bioestimulante Foltron Plus® + xenobiótico Fox Xpro®, (G) xenobióticos Fox Xpro® + Unizeb Gold®, e, (H) bioestimulante Foltron Plus® + xenobióticos Fox Xpro® e Unizeb Gold®.



Abreviações: a – clorofila *a*, b – clorofila *b*, total – clorofila total, Tleaf – temperatura da folha, ci – concentração interna de CO₂, E – transpiração, gs – condutância estomática, foto – fotossíntese, RWC – conteúdo relativo de água, md – dano de membrana, cond – condutividade elétrica, PL – peroxidação lipídica, H₂O₂ – peróxido de hidrogênio, O₂ – superóxido, APX – ascorbato peroxidase, CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, tióis – tióis não proteicos, oxido – óxido nítrico, pro – prolina.



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia