**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Ácido salicílico e mancozebe na cultura de feijão: parâmetros fisiológicos e componentes de produção

João Paulo Júnior

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2017**

João Paulo Júnior
Engenheiro Agrônomo

Ácido salicílico e mancozebe na cultura de feijão: parâmetros fisiológicos e componentes de produção

Orientador:
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Paulo Junior, João

Ácido salicílico e mancozebe na cultura de feijão: parâmetros fisiológicos e componentes de produção / João Paulo Junior. - - Piracicaba, 2017.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fungicida multissítio 2. Hormônio 3. Metabolismo antioxidante 4.
Phaseolus vulgaris L. I. Título

Aos meus pais João Augusto de Paula e Maria José das Graças de Paula pelos exemplos de fé e perseverança e a minha esposa Carine Oliveira de Paula e filhas Camilla Oliveira de Paula e Amanda Oliveira de Paula por todo amor, carinho e compreensão com que me impulsionaram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por me conduzir e iluminar meus passos me permitindo chegar até aqui;

A minha esposa Carine Oliveira de Paula e minhas filhas Camilla Oliveira de Paula e Amanda Oliveira de Paula por estarem comigo na caminhada, fazendo dos meus sonhos os seus e por esperarem em mim, mesmo nas intermináveis horas de ausência.

Ao meu orientador Durval Dourado Neto, pelos ensinamentos, pela contribuição na minha formação profissional e intelectual, pela confiança e pelo exemplo;

Ao meu orientador Evandro Binotto Fagan, pela dedicação, apoio ao desenvolvimento deste projeto, pelos ensinamentos e pela amizade. Obrigado pela contribuição no aprendizado e instauração de valores, pelos preceitos e pela afeição.

Ao meu orientador, grande colega e amigo Luis Henrique Soares pela dedicação desmedida e pelo apoio como profissional e amigo, pelos ensinamentos e pelo apreço, ao qual me espelho como modelo de determinação.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) por disponibilizar a estrutura e pelo apoio dos funcionários na realização do trabalho;

Ao NUFEP (Núcleo de Pesquisa em Fisiologia Vegetal e Estresse de Plantas) representado pelos colegas Isabella Sabrina, Jérssica Nogueira, Walquíria Fernanda, Rafael Gonçalves, Marina Rodrigues, Leandra Larissa, Aurélio Carneiro, Gustavo Cearence, Victor Barros, José Gabriel, Laiane Laura, Camila Gurgel, Felipe Araújo, Saulo Jomaa, Nathália Borges Matheus Cardoso e Letícia Mayara;

Aos meus irmãos e irmãs, cunhados e cunhadas e a todos os meus sobrinhos pelo carinho, amor, apoio e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por fazerem parte da minha família e da minha vida;

À secretária do Programa de Pós-Graduação Fitotecnia, Luciane Toledo pela presteza nas minhas solicitações;

À Oxiquímica Agrociência Ltda pelo apoio e disponibilizar sua estrutura e equipamentos, além do incentivo ao estudo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de estudo.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Aspectos ecofisiológicos e fitopatogênicos da cultura de feijão comum.....	19
2.2. Mancozebe	22
2.3. Ácido salicílico	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Local de instalação e condução do experimento.....	31
3.2. Caracterização do experimento	34
3.3. Avaliações	35
3.3.1. Atividade da nitrato redutase	35
3.3.2. Atividade da urease	35
3.3.3. Prolina	36
3.3.4. Atividade de enzimas antioxidantes.....	37
3.3.4.1. Obtenção do extrato vegetal.....	37
3.3.4.1.1. Conteúdo de proteína na folha	37
3.3.4.1.2. Atividade da superóxido dismutase	37
3.3.4.1.3. Atividade da peroxidase.....	38
3.3.5. Conteúdo de peróxido de hidrogênio	38
3.3.6. Peroxidação lipídica	39
3.3.7. Massa de matéria seca de vagens	39
3.3.8. Produtividade	39
3.4. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Metabolismo do nitrogênio	41
4.1.1. Atividade da nitrato redutase	41
4.1.2. Atividade da urease	43
4.1.3. Proteína total solúvel.....	44
4.2. Metabolismo oxidativo.....	45
4.2.1. Atividade da superóxido dismutase	45
4.2.2. Teor de peróxido de hidrogênio	46
4.2.3. Atividade da catalase	47
4.2.4. Atividade da peroxidase.....	48
4.2.5. Peroxidação lipídica	50
4.2.6. Teor de prolina na folha	51
4.3. Avaliações fenométricas	54
5. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Ácido salicílico e mancozebe na cultura de feijão: parâmetros fisiológicos e componentes de produção

A utilização de fungicidas multissítios, como é o caso do mancozebe (Mz), tem crescido bastante nas últimas safras com o intuito de evitar a resistência de fungos a fungicidas sítio-específico, além de aumentar sua eficiência no controle de doenças. No entanto, além do efeito fungicida, em áreas que receberam a aplicação destes produtos tem sido observados efeitos fisiológicos nas plantas, que vão desde a redução do nível de estresse até o aumento no teor de clorofila, o que repercute na produtividade. Associado a isto, o ácido salicílico também se torna uma estratégia importante, visto que este hormônio promove redução do nível de estresse, além de atuar na indução de resistência contra doenças. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos fisiológicos que este produtos isolados e em associação podem causar na cultura do feijoeiro comum. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de Mz e ácido salicílico em características fisiológicas, componentes de produção e produtividade da cultura do feijoeiro comum. O ensaio foi conduzido em área comercial de produção de feijão irrigado em Patos de Minas-MG entre os meses de abril e agosto de 2017. Foi adotado delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 2 constituído por cinco doses de ácido salicílico (0, 50, 100, 200 e 400 mg ha⁻¹) associados ou não a aplicação de Mz na dose de 400 g ha⁻¹ e cinco repetições. Para cada tratamento, foram realizadas três aplicações, sendo estas aos 22, 37 e 52 dias após a semeadura. Foram realizadas avaliações de massa de matéria seca de vagens, produtividade, atividade da nitrato redutase, urease, enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT), teor de prolina, peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios. A aplicação de Mz proporcionou o aumento da atividade da SOD, sendo assim também ocorreu o incremento POD e da CAT, consequentemente reduzindo o peróxido de hidrogênio em folhas de feijoeiro, o que manteve baixo os níveis de peroxidação lipídica. Além disso, os níveis de prolina caíram significativamente após a aplicação de Mz. Quando se utilizou o Mz associado com o ácido salicílico, se observou que ocorreu o aumento da atividade da SOD, atingindo o seu pico para a dose de 200 mg ha⁻¹. Além disso o ácido salicílico promoveu o incremento de prolina quando associado ao Mz, em relação ao tratamento com Mz isolado. Nesta situação a prolina foi reponsável pela eliminação de H₂O₂, mantendo os níveis das enzimas SOD e CAT reduzidos. Com os baixos níveis de peróxido de hidrogênio a peroxidação lipídica reduziu significativamente. As aplicações de Mz refletiram na maior massa seca de vagens e implicando na maior produtividade do feijoeiro, ao passo que o ácido salicílico proporcionou o aumento de produtividade, porém dependente da dose utilizada que apresentou o melhor resultado na dose de 200 mg ha⁻¹.

Palavras-chave: Fungicida multissítio; Hormônio; Metabolismo; Antioxidante; *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT

Salicylic acid and mancozeb in common bean crop: physiological parameters and production components

The use of multisite fungicides, such as mancozeb (Mz), has grown in the last few seasons in order to avoid fungal resistance to specific-site fungicides, in addition to increasing its efficiency in disease control. However, in addition to the fungicidal effect, in areas that have received the application of these products, physiological effects have been observed in the plants, ranging from the reduction of the stress level to the increase in chlorophyll content, which has an impact on productivity. Associated with this, salicylic acid also becomes an important strategy, since this hormone promotes reduction of stress level, besides acting in the induction of resistance against diseases. However, knowledge about physiological effects is well limited on what isolated and associated products can cause on the common bean crop. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of Mz and salicylic acid applications on physiological characteristics, production components and productivity of the common bean crop. The experiment was carried out in a commercial area of irrigated common bean production in 'Patos de Minas'-MG between April and August 2017. A randomized complete block design was used in a 5 x 2 factorial scheme consisting of five doses of salicylic acid (0, 50, 100, 200 and 400 mg ha⁻¹) with or without the application of Mz at a dose of 400 g ha⁻¹ and five replications. For each treatment, three applications were performed, being these at 22, 37 and 52 days after sowing. Nitrate reductase activity, urease, antioxidant enzymes (SOD, POD and CAT), proline content, hydrogen peroxide and lipid peroxidation were evaluated. The application of Mz provided the increase of the SOD activity, thus also the POD and CAT increase, consequently reducing the hydrogen peroxide in leaves of common bean, which kept the levels of lipid peroxidation low. In addition, proline levels dropped significantly after application of Mz. When Mz associated with salicylic acid was used, it was observed that the increase in SOD activity occurred, reaching its peak at the 200 mg ha⁻¹ dose. In addition, salicylic acid promoted the increase of proline when associated with Mz, in relation to the treatment with Mz alone. In this situation proline was responsible for the elimination of H₂O₂, keeping the levels of the SOD and CAT enzymes reduced. With the low levels of hydrogen peroxide the lipid peroxidation reduced significantly. The Mz applications reflected in the higher dry mass of pods and implying a higher yield of common bean, while salicylic acid provided the increase in productivity, however, depending on the dose used, which presented the best result at 200 mg ha⁻¹.

Keywords: Multisite fungicide; Hormone; Antioxidant metabolism; *Phaseolus vulgaris* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do mancozebe proposta por Wang et al. (1993).	24
Figura 2. Via de biossíntese do ácido salicílico dependente do ácido corísmico oriundo do ácido chiquímico (Adaptado de Khan et al., 2015).	27
Figura 3. Esquema resumido dos sistemas de reação ou defesa das plantas. Adaptado de Velini et al., 2009.	29
Figura 4. Valores de umidade do solo (%), lâmina de irrigação aplicada (mm), temperatura máxima e mínima referentes ao período de condução do ensaio (25 de abril de 2017 a 18 de julho de 2017). Patos de Minas-MG, 2017.....	31
Figura 5. Atividade da nitrato redutase ($\mu\text{g N-NO}_2 \text{ mg FSF h}^{-1}$) aos 7 dias após a primeira aplicação (a) e aos 7 dias após a segunda aplicação (b) de ácido salicílico e mancozebe em feijoeiro comum. Patos de Minas-MG, 2017.	42
Figura 6. Atividade da urease ($\text{U, } \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.	43
Figura 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD, $\text{U } \mu\text{g proteína}^{-1}$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	46
Figura 8. Atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	48
Figura 9. Atividade da enzima peroxidase (POD, $\mu\text{mol [purpurogalina] min}^{-1} \text{ mg}^{-1}[\text{proteína}]$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	49
Figura 10. Peroxidação lipídica foliar (PL, $\text{nmol [TBARS] g}^{-1}[\text{MF}]$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	51
Figura 11. Teor de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}[\text{MF}]$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas, 2017.....	53
Figura 12. Esquema resumido do metabolismo oxidativo em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estádios fenológicos da cultura do feijão comum propostos por Fernandez et al. (1985).	21
Tabela 2. Parâmetros da análise de solo na profundidade de 0 – 20 e 20 – 40 cm na área de condução do experimento. Patos de Minas-MG. 2017.	32
Tabela 3. Descrição dos tratamentos utilizados na cultura de feijão comum. Patos de Minas-MG. 2017	34
Tabela 4. Teor de proteína solúvel total (mg g^{-1} MF) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	44
Tabela 5. Teor de peróxido de hidrogênio foliar (H_2O_2 , $\mu\text{mol g}^{-1}$ [MF]) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.	47
Tabela 6. Massa de matéria seca de vagens (g planta^{-1}) aos 103 DAS em feijoeiro comum submetido à aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.	55
Tabela 7. Produtividade de feijão (kg ha^{-1}) em feijoeiro comum submetido à aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANR	atividade da nitrato redutase
AS	ácido salicílico
CABMV	Cowpea aphid borne mosaic vírus
CAT	catalase
CTC	capacidade de troca de cátions
CV	coeficiente de variação
Cwa	clima tropical de altitude
DAS	dias após a semeadura
DMS	diferença média significativa
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBDC	etileno bisditiocarbamato
EBI	etileno bisisotiocinato
EBIS	sulfito de etileno bisisotiocinato
EC	concentrado emulsionável
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPSPS	5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintetase
ERO	espécies reativas de oxigênio
EW	emulsão de óleo em água
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
FSF	fitomassa fresca
IAF	índice de área foliar
IDM	inibidores da desmetilação
IQo	inibidores da quinona oxidase
ISDH	inibidores da succinato desidrogenase
JA	ácido jasmônico
KI	iodeto de potássio
LAR	resistência local
MAP	fosfato monoamônico
MBC	metil benzimidazol carbamato
MF	massa fresca
Mz	mancozebe
NBT	nitroblue tetrazolium

NR	nitrato resutase
OD	suspensão concentrada em óleo
PAL	fenilalanina amonialiase
pH	potencial hidrogeniônico
PL	peroxidação lipídica
POD	peroxidase
RPM	rotações por minute
rpm	rotações por minuto
RuBisCO	ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxidase
SAR	resistência sistêmica adquirida
SB	soma de bases
SC	suspensão concentrada
SOD	superoxidase dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus celsius
$\mu\text{g g}^{-1}$	micrograma por grama
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromol
Al	alumínio
B	boro
Ca	calico
$\text{Ca}(\text{OAc})_2$	acetato de cálcio
Cl	cloro
cm	centímetro
$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	centimol de carga por decímetro cúbico
CO_2	dióxido de carbono
Cu	cobre
Fe	ferro
g	grama
g ha^{-1}	grama por hectare
g L^{-1}	grama por litro
H	hidrogênio
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
K	potássio
kg	quilograma
kg ha^{-1}	quilograma por hectare
kgf cm^2	quilograma força por centímetro quadrado
KCl	cloreto de potássio
KNO_3	nitrato de potássio
K_2O	óxido de potássio
L ha^{-1}	litros por hectare
m	metro
M	mol
m%	porcentagem de saturação por alumínio
m^2	metro quadrado

Mg	magnésio
mL ha ⁻¹	mililitros por hectare
mL kg ⁻¹	mililitros por quilograma
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
Mn	manganês
mol L ⁻¹	mol por litro
N	nitrogênio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
NaH ₂ PO ₄	fosfato monossódico
NaOCl	hipoclorito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₃	amônia
NH ₄ ⁺	amônio
nm	nanômetro
NO ₂ ⁻	nitrito
O ₂	oxigênio molecular
P ₂ O ₅	pentóxido de difosforo
S	enxofre
t ha ⁻¹	toneladas por hectare
v%	porcentagem de saturação por bases
Zn	zinco

1. INTRODUÇÃO

A cultura de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta enorme importância econômica e social para o Brasil, principalmente por ser um dos alimentos chave da dieta dos brasileiros e por ser utilizado como cultura de subsistência de inúmeras famílias ao longo do País. Prova disso é que na safra 16/17 foram cultivadas 3,18 milhões de hectares de norte a sul do País e em todas as épocas do ano. Como a produtividade média brasileira não ultrapassa 1.100 kg ha⁻¹, a estimativa de produção está em torno de 3,4 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

A baixa produtividade média do feijoeiro comum se deve a vários fatores, entre eles o baixo emprego de tecnologia em algumas regiões de cultivo, o cultivo em épocas com baixa disponibilidade hídrica e várias pragas e patógenos que podem comprometer o rendimento das plantas. Nas condições do Cerrado brasileiro, a Embrapa (2012) cita pelo menos 23 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides importantes. Estas, dependendo da época e da severidade da infecção, podem causar perdas de até 100% da produtividade. Além disso, a maior parte das variedades cultivadas de feijão utilizadas na atualidade apresentam curta duração do ciclo (aproximadamente 80 dias) e hábito de crescimento prostrado a semiereto, o que torna a planta mais sensível e dificulta o manejo das doenças na cultura (VIEIRA et al., 2013).

Os fungicidas são utilizados na agricultura a mais de duzentos anos e desde então muitos produtos diferentes grupos químicos foram introduzidos com o objetivo de proteger a planta contra a infecção de patógenos ou controlar as doenças após o seu aparecimento. Diversas moléculas com ação antifúngica e que atuam em diferentes sítios de ação têm sido utilizados (AZEVEDO, 2017). Com o avanço da tecnologia a cadeia produtora agrícola buscou por princípios ativos cada vez mais eficazes, sendo encontrados em sua maior parte pela alta especificidade das substâncias, que atuam em locais específicos do patógenos e que entre outros fatores, contribuem para a seleção de indivíduos especialmente capazes de se desenvolver mesmo após serem expostos a tais moléculas, como está acontecendo com os fungicidas metil benzimidazol carbamato (MBC), os inibidores da desmetilação (IDM), os inibidores de quinona oxidase (IQo) e os inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). Em contrapartida a este ponto, especialmente nas últimas safras, a utilização de fungicidas multissítios tem ganhado relevância. Estes são importantes porque reduzem o risco do aparecimento de populações de patógenos resistentes (BALARDIN et al., 2017).

Nesse sentido, a utilização de mancozebe (Mz) tem sido uma das estratégias adotadas pelos produtores de feijão e de outras culturas como soja, milho e algodão, conceituando uma nova tecnologia que começa a ser utilizada para proteção de plantas, com fungicidas protetores para manejar a resistência dos patógenos aos principais grupos de fungicidas de ação em sítios específicos registrados (BALARDIN et al., 2017; AZEVEDO, 2017). Este fungicida é pertencente ao grupo dos ditiocarbamatos, com modo de ação multissítios e ação protetora sobre os patógenos. Isso significa que o Mz aplicado fica depositado sobre o tecido, inibindo a germinação do esporo e a infecção dos patógenos (GULLINO et al., 2010). Além da ação fungicida, têm sido observados efeitos adicionais quando este é aplicado. Redução na fitotoxidez causadas por fungicidas IDM e IQo, que reflete em atenuação da redução do teor de clorofilas e carotenoides, da fotossíntese líquida e danos em membranas causado pela aplicação da mistura IDM e IQo, acompanhado do incremento na concentração de enxofre (S), zinco (Zn) e manganês (Mn) e nitrogênio (N) na folha tem sido observado após aplicação de Mz (BALARDIN et al., 2017; MARQUES, 2017).

A utilização de ácido salicílico (AS) também pode contribuir para o manejo das doenças na cultura de feijão. Este hormônio é conhecido como importante sinalizador na resposta das plantas a imunidade, conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR). Este mecanismo permite que as plantas desenvolvam estratégias de resistência para futuras infecções de patógenos, o que reduz a severidade das doenças (AN; MOU, 2011). Ainda, o AS afeta a estrutura dos cloroplastos, das clorofilas, o fechamento estomático, o teor de carotenoides, a atividade de enzimas como RuBisCO, anidrase carbônica e nitrato redutase (NR) e o metabolismo antioxidante (RIVAS-SAN VICENTE; PLASENCIA, 2011). Estas ações em conjunto promovem redução no nível de estresse das plantas (HERRERA-VÁSQUEZ; SALINAS; HOLUIGUE, 2015) e, às vezes, aumento no crescimento das plantas (REITZ; GIFFORD; SCHÄFER, 2015).

Desta forma, tem sido especulado que associações entre Mz e AS podem promover redução na incidência de doenças na cultura de feijão, além de aumentar a eficiência de controle proporcionada pelos fungicidas sítio-específicos. Também, acredita-se que esta associação pode reduzir o nível de estresses das plantas, e promover incremento na produtividade, devido aos efeitos adicionais relatados anteriormente para o Mz e AS. Esta tecnologia poderá fornecer aos produtores de feijão uma nova ferramenta para o manejo das doenças, além de contribuir na eficiência de controle dos fungicidas sítio-específicos, reduzindo o risco de resistência dos patógenos. Ainda, a redução do nível de estresse proporcionado pela associação Mz + AS tornará as plantas mais eficientes na utilização dos

recursos do ambiente, o que reflete na produtividade da cultura. No entanto, ainda são escassas as pesquisas que investigam como estes produtos modulam variáveis bioquímicas, fisiológicas e fenométricas e como isto reflete no desenvolvimento da cultura de feijão.

Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de Mz e AS no acúmulo de massa de matéria seca de vagens, produtividade, atividade da NR, urease, enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT), teor de prolina, peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios na cultura de feijão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos ecofisiológicos e fitopatogênicos da cultura de feijão comum

O feijão comum é uma cultura com grande importância socioeconômica para o Brasil, por ser uma importante fonte de proteína, que compõe a dieta dos brasileiros. Além disso, é cultivada de norte a sul do País, em sistemas que vão desde a agricultura familiar (normalmente áreas pequenas e com pouco emprego de tecnologia) até grandes produtores (áreas extensas de elevado nível tecnológico) (EMBRAPA, 2012).

Embora seja cultivado ao longo de todo o país durante quase todo o ano, o feijão comum é uma cultura relativamente exigente em condições de ambiente favorável ao desenvolvimento, sendo uma cultura com baixa tolerância a condições extremas. Desta forma, a temperatura média ótima durante o ciclo da cultura está entre 17 e 25°C, sendo 21°C a ideal. Durante a germinação de sementes, temperaturas em torno de 28°C são consideradas ótimas, pois permite rápida germinação e emergência e reduz a possibilidade de problemas causados por pragas e patógenos de solo. Além disso, relatos mostram que quando a temperatura é inferior à 10°C as plantas não sobrevivem, sendo esta considerada a temperatura basal para a cultura. Entre 10 e 15°C, ocorre redução na velocidade de germinação e emergência, redução do crescimento de ramos reprodutivos e na germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico (DIDONET; SILVA, 2004; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

A cultura do feijão comum é bastante sensível à altas temperaturas, principalmente quando estas acontecem durante a pré-antese e o desenvolvimento reprodutivo. Nestas fases, temperaturas entre 30 e 40°C causam aborto de botões florais, flores e vagens e reduz a produtividade (DIDONET; SILVA, 2004; EMBRAPA, 2012). Segundo Silveira et al. (1980) e Mariot (1989), quando ocorrem temperaturas diurnas e noturnas acima de 30 e 20°C, respectivamente, a abscisão de órgãos reprodutivos pode ser superior a 50%.

Além disso, o feijão comum apresenta ciclo fotossintético C₃, ou seja, nesta planta não há a presença da bainha vascular como em plantas C₄. Desta forma, a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxidase (RuBisCO) apresenta atividade carboxilase e oxigenase, dependendo da relação CO₂/O₂ na câmara subestomática. Em condições que favorecem o fechamento dos estômatos (temperaturas elevadas, déficit hídrico) e consequentemente aumentam a concentração de O₂ na folha, ocorre aumento da atividade oxigenase, resultando em um processo denominado fotorrespiração. Este processo diminui a eficiência fotossintética

da cultura, embora isto possa ser considerada uma estratégia da planta para manter a produção de fotoassimilados mesmo em condições de estresse (TAIZ et al., 2017).

Com base nestas informações, considera-se que a cultura de feijão se desenvolve melhor sob temperaturas amenas. Esta característica, associada ao baixo ponto de compensação luminoso da cultura, permite que esta seja cultivada durante o outono-inverno na região do Cerrado, desde que haja disponibilidade de água (DIDONET; SILVA, 2004; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006; EMBRAPA, 2012).

A necessidade hídrica da cultura varia de acordo com o ambiente de produção (clima e solo), da época de semeadura, do cultivar (duração do ciclo, sistema radicular e outros) e do manejo da cultura e do solo. De modo geral, a demanda hídrica para esta cultura varia entre 300 e 470 mm (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). Além da quantidade, a distribuição da precipitação também é fundamental para garantir o suprimento de água para a cultura. Quando a precipitação é inferior a demanda ou ocorre má distribuição, a planta está sujeita ao déficit hídrico. Quando estes problemas ocorrem durante a fase inicial de desenvolvimento, há prejuízos na germinação, emergência e estabelecimento das plantas, o que resulta em redução do estande. O florescimento, a formação das vagens e o enchimento dos grãos são os períodos mais críticos quanto ao déficit hídrico. Consequentemente, a ausência de água nestas fases causa as maiores reduções na produtividade. Neste caso, a redução da produtividade está relacionada ao aborto de flores e vagens, redução do número de sementes por vagens e da massa dos grãos (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006; EMBRAPA, 2012).

O ciclo da cultura do feijão comum varia de aproximadamente 70 a 100 dias, sendo esta duração dependente da variedade cultivada, do ambiente de produção e da época de semeadura. Durante este período, o desenvolvimento da cultura é dividido em estádios fenológicos, denominados V para os estádios vegetativos e R para os reprodutivos (Tabela 1) (FERNANDEZ et al., 1985). Em cada um destes estádios, características morfológicas são determinadas, que associadas as variáveis fisiológicas, irão determinar a produtividade das plantas. Desta forma, o acúmulo de matéria seca pelas plantas, o acúmulo e a taxa de absorção de nutrientes, o índice de área foliar (IAF), entre outras características, são alteradas em função do estágio fenológico das plantas. Como exemplo, os trabalhos de Soratto et al. (2013) e Fernandes, Soratto e Santos (2013) mostram que o acúmulo de matéria seca pelas plantas é lento durante a fase inicial de desenvolvimento da cultura, atingindo o máximo entre os estádios R7 e R8. Nestes mesmo trabalhos, comportamento semelhante foi observado para a taxa de absorção de nutrientes, sendo a máxima atingida no estágio R7. Nesta mesma fase, o

trabalho de Teixeira, Stone e Heinemann (2015) mostram que as plantas apresentam o maior IAF, a qual é uma característica importante para manter a produção de fotoassimilados necessários para o enchimento dos grãos.

Tabela 1. Estádios fenológicos da cultura do feijão comum propostos por Fernandez et al. (1985).

Fase	Estádio	Descrição
Vegetativa	V ₀	Germinação: 50% das sementes com emergência da radícula através da micrópila
	V ₁	Emergência: 50% das plântulas com surgimento, na superfície do solo, do hipocótilo encurvado
	V ₂	Unifólio: 50% das plântulas com as folhas unifolioladas em posição horizontal
	V ₃	1º trifólio: 50% das plantas com a primeira folha trifoliolada completamente aberta
	V ₄	3º trifólio: 50% das plantas com a terceira folha trifoliolada completamente aberta
Reprodutiva	R ₅	Pré-florescimento
	R ₆	Florescimento: 50% das plantas com a primeira flor aberta
	R ₇	Formação das vagens: 50% das plantas com a primeira vagem exposta
	R ₈	Enchimento dos grãos: 50% das plantas com as vagens completamente expandidas e com o início da formação do grão
	R ₉	Maturação: 50% das descoloração das vagens, seguido do amarelecimento, queda das folhas e seca da planta

Aliado à duração do ciclo da cultura, o hábito de crescimento das plantas de feijão comum também é características que podem alterar o comportamento fisiológico da cultura, sendo assim aspectos importantes que auxiliam na escolha da variedade cultivada e na determinação do manejo da cultura no campo. Desta forma, plantas de feijão comum são divididas entre hábito de crescimento determinado e indeterminado. Nas de crescimento determinado há uma inflorescência no ápice das hastes principal e laterais, enquanto que naquelas de crescimento indeterminado, os meristemas apicais das hastes principal e laterais continuam o desenvolvimento vegetativo após o florescimento. Além disso, as plantas são classificadas em relação a arquitetura da parte aérea em quatro tipos, sendo: Tipo I: variedades cultivadas de hábito de crescimento determinado e arbustivo, de porte pequeno; Tipo II: de hábito de crescimento indeterminado, arbustivas e eretas; Tipo III: de crescimento indeterminado, prostrados ou semitrepadores e; Tipo IV: plantas de hábito indeterminado com grande capacidade trepadora. Como exemplo, variedades bastante cultivadas como o Pérola,

BRS Estilo e IAC Imperador são pertencentes ao Tipo III, II e I, respectivamente (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

A modalidade de cultivo adotada atualmente favorece grande parte dos patógenos que se desenvolvem na cultura do feijão comum, sendo este um dos principais fatores que reduzem a produtividade da cultura, podendo as perdas atingir 100% da produtividade, dependendo da doença e da sua intensidade. A Embrapa (2012) lista pelo menos 23 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides que são importantes para a o feijão cultivado no Cerrado brasileiro, entre estas estão a ferrugem [*Uromyces appendiculatus* (pers.) Unger.], a mancha angular [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris], a antracnose [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.)], o crestamento bacteriano [*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye] e o mosaico dourado (“Bean golden mosaic vírus” – BGMV) (ARAÚJO et al., 1996; KIMATI et al., 1997; PAULA JÚNIOR et al., 2004; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006; TOSCANO et al., 2016).

Como estratégias de controle, recomenda-se a rotação de culturas, a destruição dos restos culturais, eliminação de plantas voluntárias hospedeiras, incorporação dos restos culturais, a adequação das épocas de plantio também é importante, o tratamento de sementes, assim como a utilização de variedades cultivadas resistentes ou tolerantes (PAULA JÚNIOR et al., 2004; VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006). Como controle químico são recomendados fungicidas como Mz, fungicidas cúpricos, clorotalonil, benzimidazóis, estrobilurinas, triazóis, carboxamidas e organoestânicos para o controle das doenças do feijoeiro (AGROFIT, 2017).

2.2. Mancozebe

O mancozebe (Mz) (Figura 1) é um fungicida protetor pertencente ao grupo dos ditiocarbamatos utilizado na prevenção e controle de mais de 400 doenças causadas por fungos, em mais de 100 gêneros de plantas cultivadas (GARCIA, 1999). Originalmente, componentes do grupo ditiocarbamatos eram utilizados com aceleradores no processo de vulcanização da borracha (McCALLAN, 1967). O primeiro composto deste grupo químico com ação fungicida foi o disulfeto detetrametiluram, conhecido comercialmente como tiram, o qual teve sua patente requerida em 1934. No entanto, este só era eficiente quando aplicado em sementes. A partir daí surgiram novas moléculas baseadas em sais-metal do ácido ditiocarbâmico, como o ferbam (dimetil ditiocarbamato férrico) e o ziram (dimetil ditiocarbamato de zinco) (GULLINO et al., 2010).

Até este momento, os ditiocarbamatos eram sintetizados a partir da monoamina e disulfeto de carbono. Em 1940, estes compostos começaram a ser produzidos a partir da diamina. Assim, foi obtido o etileno bisditiocarbamato dissódico (nabam), considerado o primeiro etileno bisditiocarbamato (EBDC) verdadeiro (DIMOND; HEUBERGER; HORSFALL, 1943). O problema é que o nabam era instável na forma sólida, o que obrigava a utilização deste produto na forma líquida. 30 anos mais tarde, foi demonstrado que o nabam sozinho não apresentava ação fungicida. Apenas quando este era exposto ao ar, havia a conversão em ativos fungitóxicos. No entanto, em água este produto era altamente solúvel, mas ainda instável o que tornava a desempenho variável (BRANDES, 1953). Heuberger e Manns (1943) descobriram que a adição de sulfato de zinco no tanque de pulverização estabilizava o nabam. Este novo produto foi comercializado com o nome de Dithane D-14 em 1944, utilizado principalmente para o controle de doenças na cultura da batata. O produto formado após a adição de sulfato de zinco ao nabam foi o zinco etileno bisditiocarbamato (zineb), o qual apresenta mais estável e com maior ação fungicida superior aos produtos comercializados até aquele momento. Este recebeu o nome comercial de Dithane Z-78, o qual era utilizado principalmente para controlar *Phytophthora infestans* e *Alternaria solani* em batata. A partir dos anos 1950, a utilização destes produtos se expandiu para demais culturas e outras partes do mundo, além dos Estados Unidos (BRANDES, 1953).

Durante os anos 1940, o desenvolvimento de novos EBDC continuou acelerado até que em 1950 a DuPont garantiu a patente do manganês etileno bisditiocarbamato (maneb). Este era mais eficiente em relação ao nabam e zineb. Em 1962, Rohm and Haas registrou maneb complexado com zinco (Mz) (Figura 1), que contém 20% de manganês e 2,55% de zinco em sua composição, o qual se tornou o mais importante de todos os EBDC. Além disso, fungicidas alquilenos bisditiocarbamatos como o propineb e o metiram também foram produzidos. Nos anos 1960, os EBDC foram considerados os mais importantes e versáteis fungicidas desenvolvidos até aquele momento. A partir daí o Mz se tornou um produto de utilização mundial, sendo comercializado em quase 120 países, atendendo mais de 70 culturas. Além da utilização isolada, este também tem sido utilizado em misturas com outros fungicidas (GULLINO et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química do mancozebe proposta por Wang et al. (1993).

Os fungicidas protetores são efetivos somente se aplicados antes da ocorrência da penetração do patógeno no hospedeiro, impedindo ou reduzindo as chances de ocorrência da doença. Quando são aplicados à superfície dos órgãos vegetais, agem como uma barreira tóxica, prevenindo a penetração de fungos pela inibição da germinação dos esporos e do tubo germinativo (ZAMBOLIM; VALE; CHAVES, 1995). Além da fungitoxicidade inerente, os fungicidas deste grupo para serem eficientes, dependem de características, que de acordo com Horsfall (1945), devem ser quimicamente reativos, mas não se decompõem facilmente pela ação de fatores do ambiente; devem reagir num meio aquoso, mas sem se hidrolisar sobre o hospedeiro, nem se lixiviar pela ação da primeira chuva; devem ser capazes de se espalhar por toda a superfície a ser protegida, mas sem formar uma camada tão fina que comprometa a sua eficiência; devem ser capazes de redistribuir-se durante as chuvas, de modo a cobrir áreas não atingidas pelos depósitos iniciais, mas não devem escorrer excessivamente com essas chuvas, nem com a água de pulverização; devem ser suficientemente molháveis para entrar em suspensão na água de pulverização, mas não tão molháveis a ponto de os depósitos serem facilmente levados pelas águas das chuvas.

Os ditiocarbamatos (Mz), de um modo geral, são compostos que interferem na produção de energia e neste caso é considerado um inibidor não específico de ação múltipla apesar de existirem inibidores específicos neste grupo (AZEVEDO, 2003). São potentes agentes quelantes que privam a célula das necessidades de metais (fixação a complexo de metais; fixação e união a proteínas).

O FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) classifica os fungicidas pela forma como eles atuam nos fungos e a probabilidade de promover a seleção de fungos resistentes a determinado fungicida, sendo que os fungicidas que atuam em multissítios os menos prováveis de promover a resistência (FRAC, 2017). O Mz é classificado como um fungicida de modo de ação multissítios. Isolado, o Mz não apresenta ação fungicida. Quando exposto à água, este forma sulfeto de etileno bisisotiocinato (EBIS), o qual é convertido pela ação UV da luz em etileno bisisotiocinato (EBI). Acredita-se que EBIS e EBI são ativos

tóxicos que interferem com enzimas contendo grupos sulfidril. Assim, o efeito fungicida se dá pela interferência destes com processos bioquímicos no citoplasma e na mitocôndria das células fúngicas, o que resulta na inibição da germinação do esporo (LUDWIG; THORN, 1960; GULLINO et al., 2010).

O Mz quando aplicado forma uma barreira protetora sobre o tecido, não penetrando no interior das plantas, sem apresentar efeito curativo. Desta forma, este fungicida é considerado apenas protetor, não apresentando efeito curativo. Esta característica é importante porque a absorção pelas plantas poderia causar toxidez (GULLINO et al., 2010).

A taxa de degradação do Mz em EBIS e EBI afeta diretamente o efeito residual do fungicida. Cada partícula de Mz consiste de uma concha rica em zinco que envolve o núcleo central composto por EBDC estruturado em polímero. Esta estrutura é extremamente estável, e a baixa solubilidade da concha rica em zinco significa que o EBDC pode atravessar esta camada e ser depositado na superfície da folha a uma taxa controlada. Esta característica interfere na duração do efeito residual e na eficácia do fungicida (GULLINO et al., 2010).

De acordo com Azevedo (2017), intracelularmente em fungos, cada uma das centenas de enzimas pode ser alvo da inibição de fungicidas ditiocarbamatos, onde testes sobre enzimas que dependem de grupos sulfidrílicos, cobre e ferro, mostram a acentuada inibição da atividade em grande parte de combinações enzima/fungicida. Isso comprova a capacidade de os fungicidas reagirem indiscriminadamente com os grupos prostéticos comuns das enzimas. A extensão dessas reações in vivo dependendo nível de fungicida não decomposto e que se acumula no local de atuação na célula.

O Mz é um fungicida protetor, não penetrante, com ação residual que mata o fungo no processo de germinação dos esporos na superfície da planta e seu período de proteção sobre as plantas está relacionado ao tempo em que ele permanece na superfície da planta em uma concentração inibitória capaz de exercer o controle da doença, contudo deve ser aplicado antes que os esporos atinjam os sítios de infecção no hospedeiro (REIS; REIS, 2015)

Nas últimas safras, a utilização de fungicidas protetores como o Mz tem aumentado bastante, na maioria das vezes em associação com as misturas de triazóis + estrobilurinas, com o objetivo de aumentar a eficiência das misturas. Além disso, há baixa ou nula possibilidade de os patógenos apresentarem resistência para fungicidas como o Mz, devido a multiplicidade de sítios de atuação destas moléculas nos patógenos (BALARDIN et al., 2017). Atualmente no Brasil são registrados 21 produtos para a cultura de feijão que possuem Mz em sua composição, isoladamente ou em mistura com outros ingredientes ativos e indicados para os alvos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Uromyces*

appendiculatus, *Peronospora manchurica*, *Alternaria alternata*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Erysiphe polygoni*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phylosticta phaseolina* (AGROFIT, 2017).

Efeitos adicionais têm sido observados no campo quando o Mz é aplicado. Visualmente tem sido observado que o Mz promove um “efeito verde” nas plantas. A nível fisiológico e bioquímico, análises tem mostrado que a aplicação de Mz minimiza a fitotoxidez causadas por fungicidas inibidores da desmetilação (IDM) e os inibidores de quinona oxidase (IQo). Esta diminuição foi verificada pela atenuação da degradação das clorofilas e carotenóides e redução do nível de dano celular (peroxidação lipídica). Estes resultados refletiram em menor redução da atividade fotossintética quanto comparado a aplicação da mistura IDM + IQo. Ainda, também tem sido observados grandes incrementos na concentração de enxofre (S), zinco (Zn) e manganês (Mn) e leve aumento no teor de nitrogênio (N) nas folhas após a aplicação de Mz (BALARDIN et al., 2017; MARQUES, 2017).

2.3. Ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) foi identificado primeiramente em 1828 por Johan Büchner, pesquisador alemão. Neste momento, o pesquisador isolou a partir da casca de árvores de salgueiro uma pequena quantidade de salicina (álcool salicílico β -glucosídeo). Em 1899, a Bayer apresentou um novo medicamento, o ácido acetilsalicílico, o qual recebeu o nome de Aspirina[®], pois era derivado da *Spiraea*. Em humanos, o AS é utilizado para a redução da dor e febre, auxiliando no tratamento de inflamações e na prevenção de doenças coronária cardíaca e ataques do coração. Além disso, evidências sugerem que os salicilatos também causam supressão de tumores (HAYAT; KHAN; ALYEMENI, 2013). Em plantas, estudos têm afirmado que o AS atua em mecanismo que controlam a resistência de plantas a patógenos (AN; MOU, 2011), o fechamento dos estômatos (MATEO et al., 2004; MELOTTO et al., 2006), a produção e a degradação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HORVATH et al., 2007), a fotossíntese (UZUNOVA; POPOVA, 2000) e, às vezes, o crescimento das plantas (REITZ; GIFFORD; SCHÄFER, 2015).

O AS é um composto fenólico contendo sete carbonos, sintetizado nas plantas através de duas vias enzimáticas distintas, sendo a principal dependente da fenilalanina e a outra do isocorismato, ambos oriundos do ácido chiquímico (Figura 2) (KHAN et al., 2015). Sob condições ótimas para o desenvolvimento, a concentração de AS em folhas de *Arabidopsis*, tabaco, milho e canola é menor que $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca. No entanto, em

folhas de plantas como tomate, feijão e cevada as concentrações encontradas foram de 0,27, 0,86 e 2,13 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca, respectivamente. Além disso, em plantas de arroz foram encontradas variações de 5 a 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca (RASKIN et al., 1990; YANG; QI; MEI, 2004).

Figura 2. Via de biossíntese do ácido salicílico dependente do ácido corísmico oriundo do ácido chiquímico (Adaptado de Khan et al., 2015).

A função mais conhecida do AS em plantas é a sinalização na resposta das plantas a imunidade. Embora as plantas não possuam células específicas para a imunidade ou memória imunológica, estas apresentam capacidade de reconhecer alguns padrões associados a patógenos, a partir dos quais são desencadeadas respostas de defesa instantâneas e imunidade para infecções futuras. Durante a interação entre planta-patógeno, houve evolução dos mecanismos utilizados pelo patógeno e pelo hospedeiro na tentativa de superar as barreiras impostas por cada um destes. Uma das estratégias utilizadas pelas plantas é a síntese de proteínas de resistência, que reconhecem a presença do patógeno e induz resposta de imunidade. A ativação destas vias de sinalização resulta na formação de sinais que se movem pelo floema para locais mais distantes da infecção inicial. Esta resposta é conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual é mediada pelo AS. Desta forma, a SAR tem

sido considerada uma importante estratégia de defesa contra uma gama de patógenos, entre estes, fungos, bactérias e vírus (AN; MOU, 2011).

Trabalhando com a cultura de feijão, Gadaga et al. (2017) observaram redução próxima de 80% na área abaixo da curva de progressão de antracnose quando foi aplicado 0,25 g L⁻¹ de AS. Em pepino (*Cucumis sativus* L.), o tratamento das sementes com concentrações acima de 1 mM de AS reduz a incidência de tombamento de plântulas causado por *Pythium* sp. (BERTONCELLI et al., 2015). Em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Delg), quando AS foi aplicado uma única vez, houve redução de 57,1% na severidade de *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), vírus que induz o endurecimento dos frutos do maracujazeiro (SILVA et al., 2016).

O AS está prioritariamente envolvido à resistência de doenças provocadas por patógenos biotróficos, contudo o crescimento de plantas associado à resistência a doenças não pode ser analisado de modo reducionista, considerando-se que a síntese de AS e a indução de genes de resistência por este composto será sempre efetiva e benéfica. Na Figura 3 encontra-se um esquema resumido os sistemas de reação ou defesa das plantas (VELINI et al., 2009). O AS também pode atuar em alguns processos relacionados à fotossíntese. Alguns trabalhos têm sugerido que o AS afeta a estrutura dos cloroplastos, das clorofilas, o fechamento estomático, o teor de carotenoides e a atividade de enzimas como RuBisCO, anidrase carbônica e NR. No entanto, estes efeitos são muito dependentes da dose de AS utilizada, da planta tratada e o do ambiente de cultivo. Alta concentração de AS (1 a 5 mM) causa redução da fotossíntese líquida e da atividade da RuBisCO em plantas de cevada (PANCHEVA et al., 1996) e a redução do teor de clorofila em feijão caupi, trigo e *Arabidopsis* (RAO et al., 1997; CHANDRA; BHATT, 1998; MOHAREKAR et al., 2003). O efeito do AS na fotossíntese também pode estar relacionado ao efeito do AS no metabolismo antioxidante. Trabalhos mostram que o AS modula a atividade de enzimas antioxidantes, o que poderia atuar na degradação de radicais livres geradas durante a atividade fotossintética. Além disso, plantas que apresentaram alta concentração de AS incrementaram os níveis de glutatona e redução no nível de estresse (MATEO et al., 2006). Ainda, plantas deficientes em glutatona apresentam baixa concentração de AS (DUBREUIL-MAURIZI et al., 2011). Isso sugere que o AS desempenha papel antioxidante por modular os níveis de glutatona, embora este mecanismo ainda não seja conhecido (HERRERA-VÁSQUEZ; SALINAS; HOLUIGUE, 2015).

Estes efeitos citados anteriormente podem auxiliar na justificativa do papel do AS na redução de estresses abióticos. No trabalho realizado por Palma et al. (2009), a aplicação de AS possibilitou que plantas de feijão lidassem melhor com o estresse causado pela salinidade.

Neste caso, a redução do estresse foi baseada na diminuição da concentração de prolina, atividade da guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase, bem como pelo menor nível de peroxidação lipídica proporcionada pela aplicação de AS. O tratamento de sementes de feijão com AS também maior crescimento de plantas submetidas à estresse hídrico (SADEGHIPOUR; AGHAEI, 2012; AGOSTINI et al., 2013).

Figura 3. Esquema resumido dos sistemas de reação ou defesa das plantas. Adaptado de Velini et al., 2009.

Com base nestas informações, é possível afirmar que o AS pode promover o crescimento das plantas. No entanto, estes efeitos são muito dependentes do ambiente, pois normalmente as respostas observadas são reflexos do papel do AS em modular a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos. Um exemplo clássico de tal fato é que a indução de defesa em plantas pode reduzir o crescimento. Em condições de estresse, as plantas alteram o seu metabolismo com objetivo de direcionar os recursos, como proteínas e metabólitos secundários, para se protegerem da adversidade. Neste momento, a defesa contra o estresse é prioridade em relação à sinalização para o crescimento. Como consequência, a energia e os nutrientes são realocados em resposta ao estresse, o que causa limitação de energia para o crescimento. Ainda há a hipótese que a interação e regulação hormonal durante o estresse reduz o crescimento (REITZ; GIFFORD; SCHÄFER, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em área comercial de produção de feijão localizada na Fazenda Lenhosos, município de Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil (18° 72' de latitude Sul, 46° 54' de longitude Oeste e 773 m de altitude) entre os meses de abril e agosto de 2017. Patos de Minas, segundo a classificação de Köppen, apresenta um clima tropical de altitude (Cwa), com precipitação média anual em torno de 1400 mm, sendo a temperatura média anual igual a 21,1°C, a máxima anual 27,8°C e a mínima anual 16,3°C (SOUZA et al., 2005). Os dados meteorológicos foram coletados pela estação meteorológica completa iCrop Weather modelo HP2000 instalada na propriedade onde foi realizado o experimento e estão descritos na Figura 4.

Figura 4. Valores de umidade do solo (%), lâmina de irrigação aplicada (mm), temperatura máxima e mínima referentes ao período de condução do ensaio (25 de abril de 2017 a 18 de julho de 2017). Patos de Minas-MG, 2017.

O experimento foi realizado utilizando a espécie *Phaseolus vulgaris* L. Antes da semeadura, as sementes foram tratadas com inoculante Starfix® [*Rhizobium topici* SEMIA

4088 (1×10^9 de células por mL)] na dose de $3,0 \text{ mL kg}^{-1}$ de sementes, inseticida Cruiser® 350 FS [tiametoxam (350 g L^{-1})] na dose de $2,0 \text{ mL kg}^{-1}$ de sementes e fungicida Maxin Advanced [metalaxil-m (20 g L^{-1}) + tiabendazol (150 g L^{-1}) + fludioxonil (25 g L^{-1})] na dose de $1,0 \text{ mL kg}^{-1}$ de sementes. No sulco de semeadura, foi realizada a aplicação de inoculante Azos® [*Azospirillum brasilense* AbV-5 (1×10^8 de células por mL)] na dose de 300 mL ha^{-1} . Antes da semeadura, foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade de 0-20 e 20-40 cm na área onde o experimento foi instalado. Conforme os dados da análise de solo apresentados na Tabela 2 foi necessária a aplicação de calcário, na dose de $2,0 \text{ t ha}^{-1}$. Ainda foi aplicada $1,0 \text{ t ha}^{-1}$ de gesso agrícola. Estas aplicações foram realizadas 25 dias antes da semeadura e incorporadas a 20 cm de profundidade. Como adubação de semeadura foram utilizados $96,8 \text{ kg ha}^{-1}$ de P_2O_5 + 22 kg ha^{-1} N utilizando como fonte MAP. Imediatamente antes do plantio, foram aplicados a lanço em área total 87 kg ha^{-1} de K_2O na forma de KCl. Em cobertura, aos 25 e 68 dias após a semeadura foram aplicados 45 kg ha^{-1} de N em cada aplicação, na forma de ureia.

Tabela 2. Parâmetros da análise de solo na profundidade de 0 – 20 e 20 – 40 cm na área de condução do experimento. Patos de Minas-MG. 2017.

Parâmetro	Unidade	Método	0 – 20 cm	20 – 40 cm
pH	-	Água	5,6	5,7
H + Al	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	Ca(OAc)_2 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	2,9	2,9
Al	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	KCl 1 mol L^{-1}	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção
Ca^{2+}	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	KCl 1 mol L^{-1}	2,1	1,9
Mg^{2+}	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	KCl 1 mol L^{-1}	1,0	0,9
K^+	mg dm^{-3}	Mehlich-1	152,1	144,3
P	mg dm^{-3}	Mehlich-1	11	5,0
S	mg dm^{-3}	Fosfato monocalcico	4,0	-
B	mg dm^{-3}	Água quente	0,4	-
Fe	mg dm^{-3}	Mehlich ⁻¹	40,0	-
Mn	mg dm^{-3}	Mehlich ⁻¹	2,5	-
Zn	mg dm^{-3}	Mehlich ⁻¹	8,5	-
Cu	mg dm^{-3}	Mehlich ⁻¹	2,8	-
Matéria orgânica	%	Walkley-Black	3,1	2,2
SB	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	-	3,49	3,17
CTC_t	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	-	3,49	3,17
CTC_T	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	-	6,39	6,07
v%	%	-	54,6	52,2
m%	%	-	0	0

Foi semeado o cultivar IAC Imperador, que possui grãos do tipo carioca, de hábito de crescimento determinado (Tipo I); porte de planta semiereto, ciclo precoce e resistência à antracnose e murcha de Fusarium (CHIORATO et al., 2012). A semeadura foi realizada dia 25 de abril, distribuindo 12 sementes por metro linear com 0,5 de espaçamento entre linhas. Na colheita, havia população de 10,7 sementes por metro linear, totalizando 214.000 plantas ha⁻¹.

Para o manejo de plantas daninhas, 18 dias antes da semeadura foi realizada a dessecação das plantas daninhas e tigueras de milho utilizando Trop® [glifosato (480 g L⁻¹)] e Flumyzin® 500 [flumioxazina (500 g kg⁻¹)] na dose de 4,0 L ha⁻¹ e 70 g ha⁻¹, respectivamente, acompanhados de 50 mL ha⁻¹ do adjuvante TA 35. Aos 22 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação dos herbicidas Amplo® [bentazona (600 g L⁻¹) + imazamoxi (28 g L⁻¹)], Flex® [fomesafem (250 g L⁻¹)] e Fusilade® 250 EW [fluasifope-p-butílico (250 g L⁻¹)], acompanhados do óleo mineral Iharol® [óleo mineral (760 g L⁻¹)] na dose de 500 mL ha⁻¹.

Para o manejo de pragas, aos 22 dias após a semeadura foi realizada a aplicação de Engeo Pleno® [tiametoxam (141 g L⁻¹) + lambda-cialotrina (106 g L⁻¹)] e Abamex® [abamectina (18 g L⁻¹)] nas doses de 300 e 600 mL ha⁻¹, respectivamente. Aos 27 dias após a semeadura foi realizada a aplicação dos inseticidas Mospilan® [acetamiprido (200 g kg⁻¹)] e Match® EC [lufenuron (50 g L⁻¹)] nas doses de 300 g ha⁻¹ e 350 mL ha⁻¹, respectivamente. Aos 35 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação de Benevia® [cyantraniliprole (100 g L⁻¹)] na dose de 500 mL ha⁻¹. Aos 45 dias após a semeadura foi realizada a aplicação de Rimon Supra® [novalurom (100 g L⁻¹)] e Abamex® [abamectina (18 g L⁻¹)] nas doses de 300 e 600 mL ha⁻¹. Aos 65 dias após a semeadura foi realizada a aplicação de Voraz® [metomil (440 g L⁻¹) + novalurom (35 g L⁻¹)] na dose de 400 mL ha⁻¹ e aos 71 dias após a semeadura foi realizada a aplicação de Exalt® [espinetoram (120 g L⁻¹)] na dose de 120 mL ha⁻¹. Todas as aplicações foram acompanhadas do óleo mineral Iharol® [óleo mineral (760 g L⁻¹)] na dose de 500 mL ha⁻¹.

Para o controle de doenças, aos 22 e 71 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação de Fox® [trifloxistrobina (150 g L⁻¹) + protioconazol (175 g L⁻¹)] na dose de 500 mL ha⁻¹. Aos 45 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação de Abacus® HC [piraclostrobina (260 g L⁻¹) + epoxiconazol (160 g L⁻¹)] na dose de 300 mL ha⁻¹. Todas estas aplicações foram acompanhadas do óleo mineral Iharol® [óleo mineral (760 g L⁻¹)] na dose de 500 mL ha⁻¹. Aos 59 e 60 foi realizada a aplicação via pivô central de Frowncide 500 SC [fluazinam (500 g L⁻¹)] na dose de 1,0 L ha⁻¹.

3.2. Caracterização do experimento

Foi adotado delineamento em blocos ao acaso, constituído por 10 tratamentos e 4 repetições. Cada parcela experimental foi composta por quatro linhas espaçadas em 0,5 m entre si, com 8 metros (m) de comprimento, totalizando uma área de 16 m² por unidade experimental. A área total do experimento foi de 640 m². A área útil de cada parcela foi constituída pelas linhas centrais, descartando 0,5 m em cada extremidade da parcela. As aplicações foram realizadas aos 22, 37 e 52 dias após semeadura, utilizando produtos formulados de acordo com a Tabela 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, na dose de 1 L ha⁻¹ para os tratamentos T₆ a T₁₀ em cada aplicação e nos tratamentos T₂ a T₅ o AS foi preparado diretamente no reservatório do pulverizados na dose indicada.

Tabela 3. Descrição dos tratamentos utilizados na cultura de feijão comum. Patos de Minas-MG. 2017

Tratamento	Descrição	Dose por aplicação	Dose total aplicada
T ₁	Controle	-	-
T ₂	Ácido salicílico	50 mg ha ⁻¹	150 mg ha ⁻¹
T ₃	Ácido salicílico	100 mg ha ⁻¹	300 mg ha ⁻¹
T ₄	Ácido salicílico	200 mg ha ⁻¹	600 mg ha ⁻¹
T ₅	Ácido salicílico	400 mg ha ⁻¹	1200 mg ha ⁻¹
T ₆	Mancozebe*	400 g ha ⁻¹	1200 g ha ⁻¹
T ₇	Mancozebe + ácido salicílico*	400 g ha ⁻¹ + 50 mg ha ⁻¹	1200 g ha ⁻¹ + 150 mg ha ⁻¹
T ₈	Mancozebe + ácido salicílico*	400 g ha ⁻¹ + 100 mg ha ⁻¹	1200 g ha ⁻¹ + 300 mg ha ⁻¹
T ₉	Mancozebe + ácido salicílico*	400 g ha ⁻¹ + 200 mg ha ⁻¹	1200 g ha ⁻¹ + 600 mg ha ⁻¹
T ₁₀	Mancozebe + ácido salicílico*	400 g ha ⁻¹ + 400 mg ha ⁻¹	1200 g ha ⁻¹ + 1200 mg ha ⁻¹

*Produto formulado em suspensão concentrada oleosa na concentração de 400 g L⁻¹ do ingrediente ativo Mancozebe sem AS (T₆) e com AS nas concentrações de 50 g L⁻¹ (T₇), 100 g L⁻¹ (T₈), 200 g L⁻¹ (T₉) e 400 g L⁻¹ (T₁₀).

As aplicações dos tratamentos foram realizadas utilizando pulverizador costal propelido a CO₂. A barra utilizada continha quatro pontas tipo leque, modelo XR 110 02 espaçadas de 0,5 m entre si, perfazendo uma faixa de aplicação de 2,00 m a uma pressão constante de 2 kgf cm⁻². Para todas as aplicações foi utilizado volume de calda de 200 L ha⁻¹.

3.3. Avaliações

3.3.1. Atividade da nitrato redutase

A atividade da NR foi realizada aos 7 dias após a primeira e segunda aplicação de acordo com a metodologia proposta por Mulder, Boxma e Van Veen (1959). Assim, foram retirados 200 mg de folhas frescas na forma de disco com 0,8 cm de diâmetro, os quais foram colocados em tubos de ensaio de 15 mL com tampas contendo 4 mL de KNO_3 (0,25 M) em tampão fosfato. Os tubos de ensaio foram envolvidos em papel alumínio e mantidos em banho Maria a 35°C durante duas horas e agitado de 5 em 5 minutos. Logo após, foi pipetado 1 mL da solução de cada tubo de ensaio para balão volumétrico de 50 mL para cada um dos respectivos tratamentos, evitando partículas de folhas. Em seguida colocou-se água destilada até completar 25 mL do balão e a seguir 1 mL de ácido sulfanílico. Essa solução foi mantida em repouso de 5 a 10 min. Posteriormente adicionou-se 1 mL de alfa-naftalamina e 1 mL do tampão de acetato de sódio e completou-se o volume a 50 mL com água destilada. A leitura foi realizada depois de 10 e antes de 30 minutos no Espectrofotômetro, o qual foi ajustado ao valor zero com água destilada, a uma leitura de 540 nm.

A estimativa da atividade da NR foi obtida por meio da curva padrão de nitrito (NO_2^-), ajustada de acordo com as concentrações de N na forma de NO_2^- . A partir das absorbâncias, foi ajustado o gráfico (concentração x leitura), obtendo-se a equação de regressão linear. De acordo com esses dados, foi realizado o cálculo da atividade da NR, expressos em μg de N- NO_2 por g de fitomassa verde por hora.

3.3.2. Atividade da urease

A determinação da atividade da urease foi realizada no aos 3 dias após a terceira aplicação. Foi utilizada metodologia adaptada de Hogan et al. (1983) e baseada na medida de amônia derivada da hidrólise enzimática da ureia. Sendo assim, o material vegetal foi coletado às 09:00 h em caixa de isopor e transportada ao Laboratório NUFEP. Posteriormente, 100 mg de massa fresca, foi obtida em forma de discos foliares, o qual foram colocados em tubos de ensaio contendo 8 mL de tampão fosfato com ureia (pH 7,4) para determinação do teor de NH_3 (amônia). O preparo do tampão é preparado com NaH_2PO_4 (0,20 M), Na_2HPO_4 (0,50 M), n-propanol (0,66 M), ureia (0,21 M). A solução tampão contém n-propanol, a fim de aumentar a permeabilidade dos tecidos e evitar a formação de amônia pela presença de contaminantes

microbianos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 30°C por 3 horas, sem a presença de luz, com tubos foram cobertos com folhas de papel alumínio ao redor, a uma agitação constante.

A determinação do N-NH_4^+ segue a metodologia sugerida por McCullough (1967). Após o período de incubação, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do extrato e adicionado 2,5 mL do Reagente I (Fenol 0,1 M, nitroprussiato de sódio 170 μM) e em seguida, adicionou-se 2,5 mL do Reagente II (NaOH 0,125 M + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ 0,15 M + NaOCl -3% Cl) para extrair a amônia retida aos tecidos foliares. Os tubos foram tampados para evitar a perda de NH_3 e deixados por 35 minutos em banho-maria a 37°C e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 625 nm. A atividade da enzima foi determinada pela quantidade de amônio (NH_4^+) produzida e, os valores encontrados foram comparados com uma curva padrão de amônio, previamente estabelecida, utilizando NH_4Cl . Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol} [\text{NH}_4^+] \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} [\text{MF}]$.

3.3.3. Prolina

A determinação do teor de prolina foi realizada aos 3 dias após a terceira aplicação. Para determinação do teor de prolina, 200 mg de material vegetal liofilizado foram adicionados a 8 mL de ácido sulfossalicílico (3%), sendo a mistura deixada em agitação constante por uma hora à temperatura ambiente (25°C). Após esse período, o homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi utilizado para determinação de prolina livre, de acordo com o método descrito por Bates, Waldren e Teare (1973), com algumas adaptações. Para uma alíquota de 1 mL do extrato, foi adicionado 1 mL de solução de ninhidrina ácida [1,25 g ninhidrina ácida + 30 mL de ácido acético glacial + ácido fosfórico (6 M)] + 1 mL de ácido acético glacial. Essa mistura foi mantida em tubos com tampa rosqueável em banho Maria a 100°C durante uma hora. Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em banho de gelo por 10 minutos para cessar a reação. A extração do cromóforo foi feita pela adição de 2 mL de tolueno à mistura de reação, seguida de agitação vigorosa. Após repouso e formação da mistura bifásica, a fase superior foi retirada para a quantificação dos níveis de prolina livre, através de medidas de absorbância em 520 nm realizadas em espectrofotômetro. Utilizou-se como branco apenas o tolueno. Como padrão foi utilizado a prolina pura e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} [\text{MF}]$.

3.3.4. Atividade de enzimas antioxidantes

A determinação da atividade das enzimas antioxidantes foi realizada aos 3 dias após a terceira aplicação.

3.3.4.1. Obtenção do extrato vegetal

Para estas análises, as amostras de folhas foram coletadas entre oito e dez da manhã, horário em que as enzimas expressam maior atividade. Estas amostras foram colocadas em sacos plásticos e embrulhadas em papel alumínio. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido, a fim de paralisar todas as reações imediatamente.

A extração do material vegetal foi realizada de acordo com Kar e Mishra (1976), com algumas modificações. Para isto, as folhas foram maceradas utilizando-se nitrogênio líquido, logo após foi realizada a extração adicionando 4 mL de tampão de fosfato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,8) sobre 400 mg do material vegetal macerado. As amostras foram então, transferidas para eppendorf's e centrifugadas a 10.000 rpm (6.000 g) por 30 min a 4°C . Ao final, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior determinação.

3.3.4.1.1. Conteúdo de proteína na folha

Para determinação do teor de proteína na folha foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). Sendo assim, o meio de reação foi composto por 30 μL de extrato vegetal + 1 mL de Reagente de Bradford e, após 5 minutos foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Os teores de proteína foram obtidos com base em curva padrão de caseína.

3.3.4.1.2. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada segundo a metodologia de Beauchamp e Fridovich (1971). Durante a preparação dos reagentes, todos os recipientes foram envolvidos com papel alumínio para evitar reação com a luz. Foi adicionado a um tubo de ensaio 2.000 μL de tampão de fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 7,8, 30 μL de extrato enzimático, 450 μL de solução de Nitroblue Tetrazolium (NBT) + EDTA (5:4) e 500 μL de

solução de Metionina + Riboflavina (1:1). Todas as amostras foram preparadas em duplicata, sendo que, após o preparo do sistema de reação, uma das amostras foi exposta a luz durante 10 minutos, sem o papel alumínio, e a outra permanecerá com o papel alumínio. Após esse período foram realizadas leituras de absorbância a 560 nm em espectrofotômetro.

3.3.4.1.3. Atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase (POD - EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com Teisseire e Guy (2000). Para isto, foi adicionado a um tubo de ensaio 500 μL de tampão fosfato de potássio (50 mmol L^{-1} pH 6,5), 30 μL de extrato enzimático, 250 μL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) (20 mmol L^{-1}) e 220 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (5 mmol L^{-1}), totalizando um volume de 1 mL. Posteriormente, os tubos de ensaio foram deixados por 5 minutos à temperatura em torno de 25°C. Após esse período, a formação de purpurogalina foi determinada em espectrofotômetro UV-visível, a 430 nm. Para o cálculo da atividade da enzima foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,5 $\text{mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo a atividade expressa em $\mu\text{mol [purpurogalina] min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ [proteína]}$.

3.3.5. Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). Em meio ácido, o iodeto de potássio reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando iodo e água, formando um composto de coloração laranja-avermelhada. Para esta determinação, foi realizada a extração do material vegetal, em que 200 mg de folhas foram maceradas com 1 mL de TCA 0,1%. Após homogeneização as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 9700 rpm por 15 minutos a 4°C. Do sobrenadante foi retirado 200 μL ao qual foi adicionado 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μL de solução 1 M de KI. O branco consiste na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, coloca-se 200 μL de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm e a H_2O_2 quantidade de H_2O_2 é expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca. A determinação do conteúdo de H_2O_2 foi realizada aos 3 dias após a terceira aplicação.

3.3.6. Peroxidação lipídica

Foi determinada de acordo com a técnica de Heath e Packer (1968), citados por Rama Devi e Prasad (1998). Material vegetal (200 mg) liofilizado em nitrogênio líquido foi homogeneizado em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio com rosca e papel filme, e incubado em banho Maria a 90°C por 1 h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, e, em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em espectrofotômetro na faixa de 560 e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por grama de matéria fresca. A peroxidação lipídica foi realizada aos 3 dias após a terceira aplicação.

3.3.7. Massa de matéria seca de vagens

A determinação da massa de matéria seca vagens foi realizada utilizando quatro plantas para cada repetição. Cada órgão da planta foi acondicionado, separadamente, em sacos de papel, e a secagem das diferentes partes da planta foi realizada utilizando-se o método padrão de secagem em estufa com circulação de ar forçada e com temperatura de 65°C, até peso constante. Esta avaliação foi realizada aos 103 dias após a semeadura.

3.3.8. Produtividade

Após a maturidade fisiológica, as plantas foram colhidas considerando as duas linhas centrais de cada parcela, descartando 0,5 m em cada extremidade. Após a colheita manual, as plantas foram trilhadas em trilhadora acoplada ao trator. Foi determinado o teor de água dos grãos e efetuado o cálculo de produtividade com o teor de água corrigido para 13%. Os grãos foram pesados em balança digital com precisão de 0,01 grama.

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2010). Foi realizada análise de variância em fatorial e as comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metabolismo do nitrogênio

4.1.1. Atividade da nitrato redutase

Avaliando a atividade da enzima nitrato redutase (NR) (Figura 5), visualiza-se interação entre os fatores. Para os dias analisados, houve diferença estatística para todos os tratamentos, sendo que o efeito dos mesmos foi cumulativo ao longo das aplicações para a aplicação de Mz com adição de AS.

Aos sete dias após a primeira aplicação se observou um efeito distinto entre a aplicação isolada de AS e associada ao mancozebe, sendo que, os produtos associados causaram decréscimo na NR. A aplicação de Mz reduziu a atividade da enzima em 203,10% em relação ao controle e a adição do AS não interferiu na atividade quando esteve associado ao Mz, exceto na dose de 100 mg ha⁻¹. Contudo, quando se utilizou AS isolado houve decréscimo da atividade NR até a dose de 200 mg ha⁻¹ (Figura 5a).

No entanto aos sete dias após a segunda aplicação houve uma mudança nas tendências obtidas (Figura 5b). O Mz proporcionou o aumento da atividade da NR em 43,8%, embora ainda seja visível uma redução na atividade desta enzima quando se adiciona o AS ao Mz. O AS promoveu o aumento da atividade da enzima NR, sendo que o maior efeito foi observado na dose de 50 mg ha⁻¹ (Figura 5b). A influência deste hormônio no aumento da atividade da NR é citada por Fagan et al. (2015), os quais ressaltam que o AS atua na estabilidade desta enzima por atuar na sua proteção. A NR é regulada principalmente pela disponibilidade de NO₃⁻ e fotoassimilados oriundos da fotossíntese. O ácido salicílico, quando aplicado nas plantas promove aumento a síntese de prolina, pigmentos fotossintéticos e estimula o metabolismo antioxidante enzimático e não enzimático (SHAKIROVA et al., 2003). Estas alterações reduzem o nível de estresse, promovem maior síntese de açúcares nas plantas e, conseqüentemente, aumenta a atividade da NR.

Figura 5. Atividade da nitrato redutase ($\mu\text{g N-NO}_2 \text{ mg FSF h}^{-1}$) aos 7 dias após a primeira aplicação (a) e aos 7 dias após a segunda aplicação (b) de ácido salicílico e mancozebe em feijoeiro comum. Patos de Minas-MG, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.1.2. Atividade da urease

Foi observada interação significativa entre os fatores na variável atividade da urease (Figura 6). No tratamento que apresentou aplicação de Mz observou-se incremento de 115,6%, a atividade desta enzima. Quando esse fungicida foi associado ao AS, apenas na dose de 400 mg ha⁻¹ não foi observado incremento quando o Mz foi aplicado, demonstrando efeito sinérgico entre os compostos. A adição de Mz ao AS incrementou a atividade da urease nas doses de 100 e 200 mg ha⁻¹ de AS. Também se verifica o aumento da atividade da urease nas aplicações de AS isolado, exceto para a dose de 100 mg ha⁻¹, que não foi superior ao tratamento que não foi aplicado AS.

A enzima urease apresenta importante papel no metabolismo de ureídeos em leguminosas como é caso do feijão. Esta atua na quebra da ureia oriunda da degradação das purinas, que posteriormente resulta na formação de NH₃ que será destinado a formação de aminoácidos (WERNER; WITTE, 2011).

Figura 6. Atividade da urease (U, μmol NH₄⁺ g⁻¹ h⁻¹) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.1.3. Proteína total solúvel

Para o teor de proteína solúvel total (Tabela 4) não houve interação entre os fatores. Além disso, não foi observada diferença quando foi analisada as médias entre todas as doses de AS com ou sem aplicação de Mz e entre as médias da aplicação de mancozebe para as doses em cada uma das doses de AS.

A quantificação do teor e proteína na folha é de extrema importância durante o crescimento reprodutivo, uma vez que, durante esta fase as plantas de feijão redistribuem aminoácidos das folhas para o enchimento de grãos. No entanto, esta fase é a mais importante para a síntese de fotoassimilados podendo assim a perda de proteínas desestruturar a produção destas moléculas. Isso porque, as folhas são os tecidos comprometidos com a fixação fotossintética do CO₂ atmosférico através da enzima Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO). Nas folhas de soja esta enzima perfaz 50% do total de proteína solúvel (FELLER; ANDERS; DEMIREVSKA, 2008). Também segundo Larcher (2004) sob influência de estresses ambientais, a síntese de proteínas é inibida e a degradação é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres, apresentando como característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas, uma mudança nas proporções de aminoácidos e, frequentemente, um aumento elevado na concentração de prolina livre.

Tabela 4. Teor de proteína solúvel total (mg g⁻¹ MF) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

Proteína solúvel total (mg g ⁻¹ MF)			
Ácido salicílico (mg ha ⁻¹)	Mancozebe		Média
	Com	Sem	
0	3,59	4,57	4,08 A*
50	4,85	5,59	5,22 A
100	4,85	3,74	4,29 A
200	4,66	4,72	4,69 A
400	4,90	4,97	4,94 A
Média	4,57 a	4,69 a	
CV (%)	28,85	28,85	28,85
DMS	0,64	0,64	1,53

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.2. Metabolismo oxidativo

4.2.1. Atividade da superóxido dismutase

Foi observada interação entre os fatores na atividade da superóxido dismutase (SOD). Desta forma, a aplicação de AS isolado proporcionou aumento na atividade da enzima SOD até a dose de 100 mg ha⁻¹, a partir desse momento houve um decréscimo na atividade da enzima. Na mistura desse hormônio com Mz também foi constatado um acréscimo na atividade da SOD, porém com pico na dose de 200 mg ha⁻¹. Foi constatado que a adição de Mz ao AS ocasionou aumento da atividade da enzima SOD de até 105,3% quando foi utilizado a dose de 200 mg ha⁻¹ de AS. O aumento na atividade da SOD causado pela associação de Mz ao AS mostra que estes compostos atuaram de forma sinérgica para estimular a degradação de espécies tóxicas nas células. Quando o Mz não foi associado com AS houve incremento de 135,78% na atividade da enzima em relação ao tratamento sem Mz (Figura 7).

O manganês e o zinco contidos no Mz atuam como cofatores na enzima SOD. Esta pode ser uma das prováveis causas do incremento da atividade desta enzima pelo Mz. Estes dados são corroborados por Balardin et al. (2017) que encontraram aumentos significativos dos teores de manganês e zinco após aplicação de Mz. Assim, estes resultados mostram que o Mz pode reduzir o estresse das plantas, devido ao aumento na atividade da SOD. A SOD tem sido colocada como importante enzima na tolerância das plantas ao estresse, pois constitui a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos da alta concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta enzima remove O₂⁻, catalisando sua dismutação em H₂O₂ + O₂ (GILL; TUTEJA, 2010).

Os efeitos do AS na atividade das enzimas antioxidantes é bastante controverso. Inicialmente, o AS é colocado como inibidor da atividade das enzimas antioxidantes, pois durante a indução de resistência, há a necessidade de aumento na concentração de ERO, visto a importância destes como sinalizadores neste processo. Posteriormente, o aumento na concentração de ERO estimula a atividade das enzimas antioxidantes, o que reduz o nível de estresse das plantas (HERRERA-VÁSQUEZ; SALINAS; HOLUIGUE, 2015). No presente trabalho, a aplicação de doses de AS isolado incrementou a atividade da SOD, o que pode contribuir para a redução do nível de dano oxidativo nas membranas.

Figura 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD, U µg proteína⁻¹) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.2.2. Teor de peróxido de hidrogênio

Os resultados da atividade da SOD não refletiram no teor de H₂O₂, pois para esta variável não foi observada interação entre os fatores (Tabela 5). Ainda na Tabela 5, não foi observada diferença significativa quando comparado a média de todas as doses de AS com ou sem aplicação de Mz e quando analisado a médias para entre a aplicação de Mz em cada uma das doses de AS. Embora tenha sido observado incremento na atividade da SOD, é provável que o H₂O₂ produzido tenha sido rapidamente degradado pelas enzimas CAT e POD.

Balardin et al. (2017) relataram que a aplicação de Mz manteve a quantidade de H₂O₂ em níveis semelhantes a plantas sem exposição a estresse oxidativo. A produção de H₂O₂ é o reflexo do metabolismo oxidativo das plantas, tratamentos que apresentam elevados teores de H₂O₂ provavelmente estão sendo submetidos a intensos estresses ambientais que pode ocasionar danos em lipídeos de membrana, DNA, RNA e outras biomoléculas (INUPAKUTIKA et al., 2016).

A síntese de H_2O_2 é induzida por vários tipos de estresses e por isso possui papel central nos mecanismos de sobrevivência de plantas. Em resposta a muitos estresses a formação de H_2O_2 é incrementada. No entanto, é importante salientar que o incremento na síntese de H_2O_2 nem sempre pode resultar em efeitos negativos em plantas, pois esta molécula pode funcionar como agente sinalizador em plantas (NEILL et al., 2002), incluindo: respostas a elicitores de patógenos (KACHROO et al., 2003), formação de raízes laterais (ORMAN-LIGEZA et al., 2016), fechamento estomático (CHEN; GALLIE, 2004), resistência sistêmica adquirida (CHEN; SILVA; KLESSIG, 1993) e morte celular programada (LEVINE et al., 1994).

Tabela 5. Teor de peróxido de hidrogênio foliar (H_2O_2 , $\mu\text{mol g}^{-1}$ [MF]) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ MF)			
Ácido salicílico (mg ha ⁻¹)	Mancozebe		Média
	Com	Sem	
0	29,94	32,64	31,29 A*
50	29,03	25,96	27,50 A
100	34,22	29,13	31,68 A
200	30,06	24,92	27,49 A
400	27,90	28,36	28,13 A
Média	30,23 a	28,54 a	
CV (%)	16,32	16,32	16,32
DMS	2,28	2,28	5,46

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.2.3. Atividade da catalase

Mesmo sem alterações na concentração de H_2O_2 , foram observados efeitos dos tratamentos na atividade da catalase (CAT). Para esta variável, notou-se aumento de 55,7% para a aplicação de Mz. No entanto, a adição de Mz ao AS diminuiu a atividade desta enzima, exceto quando foi aplicado a dose de 400 mg ha^{-1} de AS. A aplicação de doses de AS isolado apresentou tendência na redução da atividade da CAT que só pode ser confirmada na dose de 400 mg ha^{-1} (Figura 8).

Estes resultados mostram que a aplicação isolada de AS ou associada com Mz pode causar redução na atividade da CAT, sendo este efeito dependente da dose. No entanto, ainda

não é possível afirmar se este comportamento está relacionado à redução do nível de estresse proporcionado pela mistura, o que não exigiria da planta uma elevada atividade desta enzima para degradação dos compostos tóxicos ou ao efeito inibitório da mistura na atividade da enzima.

A CAT é importante na eliminação do H_2O_2 . Como a CAT opera sem agente redutor, ela fornece às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do H_2O_2 (SHARMA et al., 2012). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM), por isso é considerada indispensável para a desintoxicação de ROS, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011).

Figura 8. Atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

* Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.2.4. Atividade da peroxidase

Quanto à atividade da peroxidase (POD) ficou evidente o efeito positivo do Mz. Desta forma, a aplicação de Mz isolado proporcionou aumento de 94,4% quando comparado

ao controle. No entanto quando se adicionou Mz ao AS houve redução gradativa da atividade da POD à medida em que se aumentou a dose de AS, demonstrando seu efeito na redução da ativação desta enzima. Não foi observada diferença significativa entre as doses de AS aplicadas isoladas (Figura 9). Da mesma forma que ocorreu para a CAT, duas hipóteses são levantadas: a primeira é que o Mz inibe a atividade da enzima e a segunda pode ser devido ao menor estresse proporcionado pela mistura, o que exigia menor atividade de enzima.

Figura 9. Atividade da enzima peroxidase (POD, μmol [purpurogalina] min^{-1} mg^{-1} [proteína]) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

* Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

A POD é amplamente distribuída em plantas superiores e envolvida em vários processos de estresse. É considerada uma enzima de alto peso molecular capaz de eliminar H_2O_2 produzida durante a dismutação enzimática e não enzimática no citosol e cloroplasto.

O aumento da atividade das POD é uma resposta metabólica relacionada a diferentes tipos de estresses (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995; JIMÉNEZ et al., 1998 e MORAES et al., 2002). Dessa forma, essa enzima, frequentemente tem sido utilizada como um parâmetro metabólico durante alterações de crescimento e condições de estresse ambiental. Portanto, o aumento da atividade da POD no cultivar de feijão testada com a

utilização dos tratamentos supracitados provavelmente possibilitou incremento da tolerância ao estresse ambiental.

A análise da SOD, CAT e POD pode ser um fator importante para determinar a condição fisiológica da planta. Em células de plantas, enzimas antioxidantes como a SOD, POD e CAT são consideradas ferramentas de defesa de proteção contra estresse oxidativo (MITTLER, 2002). O incremento da atividade da SOD, POD e CAT tem relação direta à tolerância de plantas a estresses ambientais, como estresses salinos (RAHNAMA; BRAHIMZADEH, 2005; AZEVEDO NETO et al., 2006; KOCA et al., 2007). Porém, quando a atividade da enzima é saturada antes de alcançar a máxima concentração de espécies reativas de oxigênio, pode ocorrer peroxidação lipídica.

4.2.5. Peroxidação lipídica

Aplicações isoladas de doses AS na cultura de feijão não influenciaram a peroxidação lipídica. No entanto, quando as doses de 50, 100 e 200 mg ha⁻¹ de AS foram associadas ao Mz houve redução média de 39,14% em relação ao controle (Figura 10). Estes resultados mostram que os incrementos observados na atividade das enzimas POD e SOD foram importantes para manter a peroxidação lipídica, demonstrando o papel do Mz na redução dos estresses nas plantas.

A elevada taxa de lipoperoxidação pode induzir efeitos deletérios para as células vegetais. Isso porque as espécies reativas que induzem este processo atuam em ácidos graxos de membrana, resultando na perda de rigidez, integridade e permeabilidade. Este processo produz compostos carbonílicos como o monondialdeído (GILL; TUTEJA, 2010).

Martín (2009) observou incremento nos teores de lipoperóxidos nas folhas de plantas de feijão submetidas ao estresse salino, enquanto que as mesmas plantas previamente tratadas com AS apresentaram reduções nos teores de lipoperóxidos, sendo citado por Gonçalves (2013), que encontrou uma redução de lipoperóxidos na cultura do eucalipto após aplicação de AS.

Figura 10. Peroxidação lipídica foliar (PL, nmol [TBARS] g⁻¹[MF]) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

4.2.6. Teor de prolina na folha

Para o teor de prolina foi observada interação entre os fatores. Desta forma, aplicação isolada de 100 mg ha⁻¹ proporcionou incremento no teor de prolina na folha em relação ao controle, ao passo que a dose de 400 mg ha⁻¹ promoveu redução, enquanto que as doses de 50 e 200 mg ha⁻¹ não alteraram os teores de prolina foliar. O aumento no teor de prolina no tratamento que recebeu 100 mg ha⁻¹ de AS, associado aos efeitos observados na atividade da SOD e CAT pode ter sido importante para manter baixo o nível de peroxidação lipídica. Quando o Mz foi associado ao AS, apenas na dose de 400 mg ha⁻¹ não houve redução no teor de prolina em relação ao AS isolado (Figura 11). Desta forma, a baixa peroxidação lipídica observada no tratamento que recebeu 100 mg ha⁻¹ de AS associado ao Mz pode estar relacionado ao maior acúmulo de prolina, visto que este aminoácido tem sido tratado como um importante antioxidante.

O aumento da concentração de prolina é o reflexo do nível de estresse que a planta está sendo submetida, pois esse aminoácido atua como osmorregulador, antioxidante e

protetor da atividade de enzimas. A prolina tem sido considerada um dos principais aminoácidos protetores contra estresse. Dentre suas inúmeras funções destacam-se: (i) chaperonas moleculares capazes de proteger a integridade de proteínas. Essa função inclui a prevenção da agregação e estabilização da M₄ lactato desidrogenase durante temperaturas extremas (WELTMEIER et al., 2006), proteção da enzima NR em situações de estresses por metais pesados e osmótico (SHARMA; DUBEY, 2005), além da estabilização de ribonucleases e proteases em elevadas exposições de arsênio (MISHRA; DUBEY, 2006); (ii) vários estudos tem atribuído a prolina a atividade antioxidante, sugerindo assim um potente agente com atividade “scavenging” (desintoxicante) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989; MATYSIK; ALAI BHALU; MOHANTY, 2002).

No entanto, a síntese de prolina consome entre 0,4 e 0,6% do N total das folhas. Desta forma, quando este aminoácido é sintetizado demasiadamente, pode reduzir o desenvolvimento das plantas. Portanto, a elevada síntese de deste aminoácido pode consumir parte do N que poderia ser utilizado para o crescimento. Além disso, pode ocorrer inibição do crescimento devido à toxidez desses aminoácidos quando presente em altas concentrações (ERNST; NELISSEN; BOOKUM, 2000).

Figura 11. Teor de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}[\text{MF}]$) em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para a variável mancozebe, e seguidas de letras maiúsculas não diferem entre si para a variável ácido salicílico de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

As respostas no metabolismo oxidativo da cultura de feijão estão dispostas em modelo esquemático de acordo com a Figura 12. O manganês e o zinco liberados durante a aplicação de Mz são cofatores enzimáticos, portanto a aplicação de Mz proporcionou o aumento da atividade da SOD, sendo assim ocorreu o incremento da POD e da CAT, que são importantes enzimas no processo de eliminação do H_2O_2 pelas plantas. O H_2O_2 é uma forma comum de oxigênio reativo (ERO), que pode ocasionar severas injúrias, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, modificações proteicas, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (MOLLER et al., 2007). O aumento da atividade da POD e da CAT reduzindo o H_2O_2 em folhas de feijoeiro fizeram com que os níveis de peroxidação lipídica não alterassem. Em contrapartida, os níveis de prolina, que também é importante no processo de eliminação do H_2O_2 pelas plantas, caíram significativamente após a aplicação de Mz. O processo de eliminação de ROS quando ocorre incrementos de prolina é mais dispendioso para as plantas. Comumente plantas sob estresse apresentam alteração no metabolismo oxidativo e a alteração nos teores de lipoperóxidos é indicador de prevalência de dano oxidativo nos tecidos (CATANEO et al., 2005).

Quando se utilizou o produto Mz associado com o AS, se observou que ocorreu o aumento da atividade da SOD, atingindo o seu pico para os tratamentos aplicados com este produto formulado. Além disso o AS promoveu o incremento de prolina quando associado ao Mz, em relação tratamento com Mz isolado. Nesta situação pode ter ocorrido que a prolina tenha sido responsável pela eliminação das formas reativas de oxigênio no metabolismo do feijoeiro e mantendo a quantidade de H_2O_2 baixa. Sendo assim os níveis das enzimas SOD e CAT se mantiveram reduzidos. Os níveis de H_2O_2 mantiveram-se inalterados e neste caso, reduzindo significativamente a peroxidação lipídica. Campos (2009) relatou que diferentemente da SOD, a atividade da CAT é reprimida por altos níveis de prolina livre. Plantas transgênicas com altos níveis de prolina tiveram menor atividade da CAT do que plantas controle não transformadas. A atividade da CAT em plantas controle se apresentou elevada, ao passo que plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina não apresentaram alterações na atividade da CAT.

Figura 12. Esquema resumido do metabolismo oxidativo em feijoeiro comum submetido a aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

4.3. Avaliações fenométricas

Para a variável de massa de matéria seca de vagens se observa na Tabela 6 que a aplicação de Mz aumentou a massa de matéria seca de vagens em relação aos tratamentos sem o Mz, tendo um papel significativo para aumentar este componente de produção do feijoeiro. Comparando a média entre todas as doses de AS, a aplicação de Mz proporcionou incremento de 13,2% em relação àqueles que não receberam aplicação de Mz. Também é possível que a aplicação de ácido salicílico interferiu no incremento de matéria seca de vagens, porém sendo

dependente da dose aplicada, desta forma, quando comparadas as médias dos tratamentos, a dose de 200 mg ha⁻¹ de AS proporcionou incremento de 13,8% na massa de matéria seca de vagens em relação ao controle, enquanto que os demais tratamentos não diferiram da dose de 200 mg ha⁻¹ nem do controle. Estes resultados podem ser atribuídos aos incrementos observados na atividade da SOD e POD, que proporcionou menor nível de peroxidação lipídica. Além disso, em média, esses tratamentos proporcionaram menor teor de prolina, que é um aminoácido com funções antioxidantes, mas que em elevada concentração representa elevado consumo energético na planta.

Sabe-se que a massa de vagens constitui um dos componentes de produção da cultura de feijão. Embora essa medida depende da fixação de flores e do enchimento de grãos.

Tabela 6. Massa de matéria seca de vagens (g planta⁻¹) aos 103 DAS em feijoeiro comum submetido à aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

Massa de matéria seca de vagens (g planta ⁻¹)			
Ácido salicílico (mg ha ⁻¹)	Mancozebe		Média
	Com	Sem	
0	338,60	297,19	317,90 B*
50	372,16	310,89	341,52 AB
100	375,85	335,25	355,55 AB
200	368,06	355,46	361,76 A
400	370,16	313,12	341,64 AB
Média	364,97 a	322,38 b	
CV (%)	10,33	10,33	10,33
DMS	16,95	16,95	40,62

*Médias seguidas de mesma letra minúscula coluna maiúsculas na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

Os resultados da massa de matéria seca de vagens refletiram na produtividade. Desta forma, quando relacionadas às médias das aplicações com Mz às parcelas não tratadas com este fungicidas se observa incremento positivo na produtividade. Da mesma forma também se observa interação positiva através das aplicações de AS, sendo que somente na dose de 200 mg ha⁻¹ se observa incremento de produtividade. Apesar de terem sido isolados fatores relacionados ao ataque de patógenos neste estudo, aplicações do fungicida Mz em feijoeiro proporcionaram alterações na atividade enzimática e no metabolismo fisiológico que se acresceram quando se integrou o AS na formulação. Os dados observados nas avaliações do

metabolismo oxidativo sugerem uma sinergia entre o Mz e o AS, que culminaram no aumento de produtividade observado na Tabela 7.

Tabela 7. Produtividade de feijão (kg ha^{-1}) em feijoeiro comum submetido à aplicação de ácido salicílico e mancozebe. Patos de Minas-MG, 2017.

Produtividade (kg ha ⁻¹)			
Ácido salicílico (mg ha ⁻¹)	Mancozebe		Média
	Com	Sem	
0	3423,96	3005,23	3214,59 B*
50	3763,28	3143,69	3453,49 AB
100	3800,54	3390,02	3595,28 AB
200	3721,86	3594,41	3658,14 A
400	3743,08	3166,23	3454,65 AB
Média	3690,55 a	3259,92 b	
CV (%)	10,33	10,33	10,33
DMS	171,38	171,38	410,73

*Médias seguidas de mesma letra minúscula coluna maiúsculas na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 10% de significância.

5. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos e do que foi discutido, pode-se concluir que:

(i) a aplicação de Mz e AS na cultura de feijão influencia o metabolismo do nitrogênio respondendo em aumento da atividade da nitrato redutase após aplicações sequenciais, aumenta a atividade da urease sem influenciar o teor de proteína solúvel total, altera a atividade das enzimas antioxidantes SOD, POD e CAT e o teor de prolina, mantém baixos os níveis de H_2O_2 , reduz a peroxidação de lipídeos e aumenta a massa de matéria seca de vagens e produtividade;

(ii) a aplicação de Mz isolado aumenta a atividade da nitrato redutase, aumenta a atividade da urease e não altera o teor de proteína solúvel total. O Mz reduz o teor de prolina na folha, aumenta a atividade enzimas antioxidantes SOD, POD e CAT, mantém o nível de peróxido de hidrogênio e de peroxidação lipídica, aumenta a massa de matéria seca de vagens e a produtividade do feijão;

(iii) a aplicação de AS isolado aumenta a atividade da nitrato redutase, no entanto, há diferenças entre as doses testadas, com melhores respostas para as doses de 50 e 100 $mg\ ha^{-1}$ respectivamente, aumenta a atividade da urease e não altera o teor de proteína solúvel total. O AS incrementa o teor de prolina na folha para a dose de 200 $mg\ ha^{-1}$, aumenta a atividade enzima SOD, não interfere na POD e aumenta a CAT na dose de 200 $mg\ ha^{-1}$, mantém o nível de peróxido de hidrogênio e de peroxidação lipídica, e na dose de 200 $mg\ ha^{-1}$ aumenta a massa de matéria seca de vagens e a produtividade do feijão;

(iv) a aplicação de Mz associado ao AS aumenta a atividade da nitrato redutase com melhores resposta para a dose de 50 $mg\ ha^{-1}$ de AS, incrementa a atividade da urease nas doses de 50 e 100 $mg\ ha^{-1}$ e não difere quanto ao teor de proteína solúvel total. Esta associação aumenta o teor de prolina na folha para a dose de 100 $mg\ ha^{-1}$ em relação ao Mz isolado, aumenta a atividade da enzima SOD na dose de 200 $mg\ ha^{-1}$, reduz a atividade da POD à medida em que se aumenta a dose e reduz a CAT sem interferir no nível de peróxido de hidrogênio. Também reduz a peroxidação lipídica até a dose de 200 $mg\ ha^{-1}$ e aumenta a massa de matéria seca de vagens e a produtividade do feijão na dose de 200 $mg\ ha^{-1}$ de AS;

(v) acrescentar o ácido salicílico ao mancozebe é uma opção para melhorar a performance deste fungicida em relação a produtividade.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, E.A.T; NETO, N.B.M.; CUSTODIO C.C. Induction of water deficit tolerance by cold shock and salicylic acid during germination in the common bean. **Acta Scientiarum**. v.35, n.2, p. 209-219, 2013.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 3 out. 2017.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultravioleta radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Envirionment**, v.24, p.1337-1344, 2001.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.53, p.412-428, 2011.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p. 1247-1257, 1995.
- ARAÚJO, J.L.S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N.G. Proteínas de choque térmico e tolerância a altas temperaturas em plantas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, nov. 1998. 27p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 80).
- AZEVEDO NETO, A.D.; PRICO, J.T.; ENEAS FILHO, J.; ABREU, C.E.B.; GOMES FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental Experimental of Botany**, v. 56, p. 235-241, 2006.
- AZEVEDO, E. **Alimentos orgânicos: ampliando os conceitos de saúde humana, ambiental e social**. Florianópolis: Insular, 2003. 200p.
- BALARDIN, R.S.; MADALOSSO, M.G.; STEFANELLO, M.T.; MARQUES, L.N.; DEBORTOLI, M.P. **Mancozebe**: muito além de um fungicida. Porto Alegre: Bookman, 2017, 96 p.
- BATES, L.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BERTONCELLI, D.J.; MAZARO, S.M.; ROCHA, R.C.D.S.; POSSENTI, J.C.; REY, M.S.; ZORZZI, I.C. Ácido salicílico na indução de resistência a doenças em pepino e controle de *Pythium* sp. in vitro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.2, 2015.
- BORRELL, A.K.; HAMMER, G.L.; HENZEL, R.G. Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? II. Dry matter production and yield. **Crop Science**, v.40, p.1037-1048, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDES, G.A. The history and development of the Ethylene Bisdithiocarbamate fungicides. **American Journal Potato Research**, v.30, p.137-140, 1953.
- CAMPOS, M.K.F. **Relações hídricas, trocas gasosas e atividade de enzimas antioxidantes em plantas transgênicas de citrumelo 'swingle' com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit hídrico**. Curitiba, PR. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, p. 114, 2009.
- CATANEO, A.C.; CHAMMA, K.L.; FERREIRA, L.C.; DÉSTRO, G.F.G.; SOUSA, D.C.F. Atividade de Superóxido Dismutase em Plantas de Soja (*Glycine max* L.) Cultivadas Sob Estresse Oxidativo Causado por Herbicida. **Revista Brasileira de Herbicida**, v. 4, n. 2. 2005.
- CHANDRA, A.; BHATT, R.K. Biochemical and physiological response to salicylic acid in relation to the systemic acquired resistance. **International Journal for Photosynthesis Research**, v. 35, n.2, p.255-258, 1998.
- CHEN, Z.; GALLIE, D.R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. **Plant Cell**, v.16, n.5, p.1143-1162, 2004.
- CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v.17, n.262, p.1883-1886, 1993.
- CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; CARVALHO, C.R.L.; BARROS, V.L.N.N.; BORGES, W.L.B.; TICELLI, M.; GALLO, P.B.; FINOTO, E.L.; SANTOS, N.C.B. 'IAC IMPERADOR': early maturity "carioca" bean cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.12, n.4, p.297-300, 2012.

- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.4, Safra 2016/17 - Décimo levantamento, Brasília, p.1-171, julho 2017.
- DIDONET, A.D.; SILVA, S.C. Elementos climáticos e produtividade do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v.25, n.223, p.13-19. Belo Horizonte, 2004.
- DIMOND, A.E.; HEUBERGER, J.W.; HORSFALL, J.G. A water soluble protectant fungicide with tenacity. **Phytopathology**, v.33, p.1095-1097, 1943.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield**: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.
- DUBREUIL-MAURIZI, C.; VITECEK, J.; MARTY, L.; BRANCIARD, L.; FRETTEINGER, P.; WENDEHENNE, D.; MEYER, A.J.; MAUCH, F.; POINSSOT, B. Glutathione deficiency of the Arabidopsis mutant pad2-1 affects oxidative stress-related events, defense gene expression and the hypersensitive response. **Plant Physiology**, v.157, p.2000-2012, 2011.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 248p.
- ERNST, W.H.O.; NELISSEN, H.J.M.; TEN BOOKUM, W.M.; Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. **Environmental and Experimental Botany**, v.43, p.55–71. 2000.
- FAGAN, E.B.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; CHALFUN JUNIOR, A.; DOURADO NETO, D. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. São Paulo: Andrei, 2015. 300p.
- FELLER, U.; ANDERS, I.; DEMIREVSKA, K. Degradation of Rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress. **General and Applied Plant Physiology**, v.34, p.5-18, 2008.
- FERNANDES, A.M.; SORATTO, R.G.; SANTOS, L.A. Nutrient extraction and exportation by common bean cultivars under different fertilization levels: II – micronutrients. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.1043-1056, 2013.
- FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). **Centro Internacional de Agricultura Tropical**. ISBN 84-89206-54-6. Colombia, 34 p. ilus., 1986.

- FERREIRA, D.F. SISVAR-Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.
- FRAC INTERNACIONAL. **FRAC Code List 2017**: Fungicides sorted by mode of action. Disponível em: <http://www.frac.info/publications/downloads>. Acesso em: 31 de outubro de. 2017.
- FRAC INTERNACIONAL. **Frac list of fungicide common names – 2016**. Disponível em: <http://www.frac.info/publications/downloads>. Acesso em: 31 de outubro de. 2017.
- GADAGA, S.J.C.; ABREU, M.S.; RESENDE, M.L.V.; JÚNIOR, P.M.R. Phosphites for the control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.1, p.36-44, 2017.
- GARCIA, A. **Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos**. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32p. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46).
- 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.
- GONÇALVES, K.S. **Aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio em mudas de eucalipto submetidas a deficiência hídrica**. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, p. 80, 2013
- GULLINO, M.L.; TINIVELLA, F.; GARIBALDI, A.; KEMMITT, G.M.; BACCI, L.; SHEPPARD, B. Mancozeb: past, present and future. **Plant Disease**, v.94, p.1076-1087, 2010.
- HAYAT, S.; KHAN, N.A.; ALYEMENI, M. **Salicylic acid: plant growth and development**. New York: Springer Science, 2013.
- HERRERA-VÁSQUEZ, A.; SALINAS, P.; HOLUIQUE, L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.1-9, 2015.
- HEUBERGER, J.W.; MANNS, T.F. Effect of zinc sulphate-lime on protective value of organic and copper fungicides against early blight of potato. **Phytopathology**, v.33, p.1113, 1943.
- HOGAN, M.E.; SWIFT, I.E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissue. **Phytochemistry**, v.22, p.663-665, 1983.
- HORSFALL, J. G. **Fungicides and their action**. Waalthom: Chronica Botânica. 1945, 239p.

- HORVÁTH, E.; SZALAI, G.; JANDA, T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. **Journal Plant Growth Regulation**, v.26, p.290-300, 2007.
- INUPAKUTIKA, M.A.; SOHAM SENGUPTA, S.; DEVIREDDY, A.R.; AZAD, R.K.; MITTLER, R.. The evolution of reactive oxygen species metabolism, **Journal of Experimental Botany**, v.67, n.21, p.5933-5943, 2016.
- JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A; PASTORI, G.; DEL RIO, L.A.; SEVILLA, F. Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, v.118, p. 1327-1335, 1998.
- KACHROO, A.; LAPCHYK, L.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D.; KLESSIG, D.; KACHROO, P. Plastidial Fatty Acid Signaling Modulates Salicylic Acid– and Jasmonic Acid–Mediated Defense Pathways in the Arabidopsis *ssi2* Mutant. **Plant Cell**, v.15, n.12, p.2952-2965, 2004.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KHAN, M.I.R.; FATOMA, M.; PER, T.S.; ANJUM, N.A.; KHAN, N.A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. **Frontiers in Plant Science**, v.6, article 462, 2015.
- KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 774p
- KOCA, H.; BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. **Environmental Experimental of Botany**, v. 60, p. 344-351, 2007.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, RIMA, 2004. 531p.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v., n.4, p.583-593, 1994.
- LUDWIG, R.A.; THORN, G.D. Chemistry and mode of action of dithiocarbamate fungicides. **Advances in Pest Control Research**, v.3, p.219-252, 1960.
- MARIOT, E.J. Ecofisiologia do Feijoeiro. In: IAPAR (Ed.). O feijão no Paraná. Londrina: IAPAR, 1989.
- MARQUES, L.N. **Mancozebe associado ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi* × *Glycine max*: respostas fisiológicas das plantas**. 2017. 100p Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

- MARTÍN, F.J.P. **Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino**. 2009. 395 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências, Universidade de Granada, Granada, 2009.
- MATEO, A.; FUNCK, D.; MUHLENBOCK, P.; KULAR, B.; MULLINEAUX, P.M.; KARPINSKI, S. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1795-1807, 2006.
- MATEO, A.; MUHLENBOCK, P.; RUSTERUCCI, C.; CHANG, C.C.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKA, B.; PARKER, J.E.; MULLINEAUX, P.M.; KARPINSKI, S. Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. **Plant Physiology**, v.136, p.2818-2830, 2004.
- MATYSIK, J.; ALAI BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v.82, p.525-532, 2002.
- MCCALLAN, S.E.A. **History of fungicides**. In: Fungicides, an advanced treatise. 1. Ed. New York, Academic Press, 1967. p.1-37.
- McCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v.17, n.2, p.297-304, 1967.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v.126, p.969-980, 2006.
- MISHRA, S., DUBEY, R.S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic-exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.927-936, 2002.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**. v.7, p.405-410, 2002.
- MOHAREKAR, S.T.; LOKHANDE, S.D.; HARA, T., TANAKA, R.; TANAKA, A.; CHAVAN, P.D. Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. **International Journal for Photosynthesis Research**, v.41, p.315, 2003.
- MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 58:459 – 481, 2007.
- MORAES, R.M.; KLUMP, A.; FURLAN, C.M.; KLUMP, G.; DOMINGOS, M.; RINALDI, M.C.S.; MODESTO, I.F. Tropical fruit trees as bioindicator of industrial air pollution in Southeast Brazil. **Environment International**, v.28, p.367-374, 2002.

- MULDER, E.G.; BOXMA, R.; VAN VEEN, W.L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues. **Plant and Soil**, v.10, p.335-355, 1959.
- STEVEN NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, **Journal of Experimental Botany**, Volume 59, Issue 2, 1 February 2008, Pages 165–176.
- ORMAN-LIGEZA, B., PARIZOT, B., DE RYCKE, R., FERNANDEZ, A., HIMSCHOOT, E., VAN BREUSEGEM, F., ET AL. RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. **Development**, v.143, p.3328-3339, 2016.
- PALMA, F.C; LLUCH, C.; IRIBARNE, J.M.; TEJERA GARCIA, N.A. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Growth Regulation**. 58: 307-316, 2009.
- PANCHEVA, T.V.; POPOVA, L.P.; UZUNOVA, A.N. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. **Jornal Plant Physiologist**, v.149, p.57-63, 1996.
- BOECHAT, L.T; PINTO, F.A.C; PAULA JÚNIOR, T.J.; QUEIROZ, D.M.; TEIXEIRA, H. Detecção do mofo-branco no feijoeiro, utilizando características espectrais. **Revista Ceres**, v.61, n.6, p. 907-915, nov/dez, 2014.
- RAHNAMA, H.; EBRAHIMZADEH, H. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. **Biology of Plants**, v.49, p.93-97, 2005.
- RAMA DEVI, S.; PRASAD, M.N.V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v.138, p.157-165, 1998.
- RAO, M.V.; DAVIS, K.R. Ozone-induced cell death via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. **Plant Journal**, v.17, p.603-614, 1999.
- RASKIN, I.; SKUBATZ, Z.; TANG, W.; MEEUSE, B.J.D. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. **Annals of Botany**, v.66, p.369-373, 1990.
- REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M.; DANELLI, A. L. D. Ferrugem Asiática. In: REIS, E. M.; TREZZI, R. T. **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Editora Berthier, 2012. 436p.
- REITZ, M.U.; GIFFORD, M.L.; SCHAFER, P. Hormone activities and the cell cycle machinery in immunity-triggered growth inhibition. **Journal of Experimental Botany**, v.66, n.8, p. 2187-2197, 2015.
- RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defense: its role growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.10. p.1-18, 2011.

- SADEGHIPOUR, O.P.; AGHAE, P. The role of exogenous salicylic acid (SA) on phytohormonal changes and drought tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v.2, n.12, p.8-15, 2012.
- SHAKIROVA, F.M.; SAKHABUTDINOVA, A.R.; BEZRUKOVA, M.V.; FATHUDINOVA, R.A.; FATHUTDINOVA, D.R. Changes in hormonal status of wheat seedlings induced by Salicylic acid and salinity. **Plant Science**, v.164, p. 317-322, 2003.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, n.17, p.35-52, 2005.
- SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.12, p.1-26, 2012.
- SILVA, M.S.; SILVA, R.P.; SOUZA, A.V.L.; XAVIER, Y.P.M.; OLIVEIRA, A.C.; COQUEIRO, D.S.O. Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p.1-7, 2016.
- SILVEIRA, P.M.; CASTRO, T.A.P.; STONE, L.F. Idade de floração e vingamento de flores em duas cultivares de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.15, n.2, p.229-232, 1980.
- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v.28. n.4, p.1057-1060, 1989.
- SORATTO, R.P.; FERNANDES, A.M.; SANTOS, L.A.; JOB, A.L.G. Nutrient extraction and exportation by common bean cultivars under different fertilization levels: I – macronutrients. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.1027-1042, 2013.
- SOUZA, D.V.; CABRAL, J.B.P.; LOPES, R.M.; REIS, M.A.S.; OLIVEIRA, S.F. Análise pluviométrica da carta topográfica de Patos de Minas referente ao período de 1978 a 2003. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57, 2005, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UECE, 2005. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/57ra/>. Acesso em: 27 nov. 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000.

- TEIXEIRA, G.C.S.; STONE, L.F.; HEINEMANN, A.B. Eficiência do uso da radiação solar e índices morfofisiológicos em cultivares de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, n.1, p.9-17, jan./mar. 2015.
- TOSCANO, L.C.; AGUIRRE, W.M.; TOMQUELSKI, G.V.; MARUYAMA, W.I.; GOUVEIRA, G.C.C.; DIAS, P.M. Dinâmica populacional de mosca-branca, incidência do mosaico dourado do feijoeiro e alternativas de controle da praga no “Cultivo das Secas” no Cerrado. **EntomoBrasilis**. v. 9, p. 18-25, 2016.
- UZUNOVA, A.N.; POPOVA, L.P. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. **Photosynthetica**, v.38, p.243-250, 2000.
- VELINI, E.D.; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. 1 ed. Botucatu: FEPAF, 2009. 496p.
- VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed., Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2006. 600p.
- VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais da cultura do Estado de Minas**. UFV: Viçosa, 2011, 596 p.
- WANG, G.J.; YIN, C.M.; WANG, Y.; KONG, Y.H.; WANG, G.H.; WU, C.Y.; ZHANG, L.F.; LIU, Z.R. The thermal behavior of the ethylenebis-dithiocarbamates Maneb, Zineb and Mancozebe. Part 1. The mechanism of the thermal decomposition, **Thermochimica Acta**, v.220, p.213-227, 1993.
- WELTMEIER, F.; RAHMANI, F.; EHLERT, A.; DIETRICH, K.; SCHÜTZE, K.; WANG, X.; DRÖGE-LASER, W. Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. **Plant Molecular Biology**, v.69, n.1, 2009.
- WERNER, T.; WITTE, C.P. The biochemistry of nitrogen remobilization: purines rings catabolism. **Trends in Plant Science**, v.16, p.381-387, 2011.
- YANG, Y.; QI, M.; MEI, C. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. **Plant Journal**, v.40, p.909-919. 2004.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; CHAVES, G.M. **Controle químico de doenças de plantas**. Brasília: ABEAS, 1995, 307p.