**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapirroxade, isolado e em
mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja**

Daniela Resende Carrijo

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

**Piracicaba
2014**

Daniela Resende Carrijo
Engenheira Agrônoma

**Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapiroxade, isolado e em
mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja**

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

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

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Carrijo, Daniela Resende

Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapiroxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja / Daniela Resende Carrijo. - - Piracicaba, 2014.
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Carboxamidas 2. Estrobilurinas 3. Triazóis I. Título

CDD 633.34
C316e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ricardo e Ilma, pelo amor incondicional,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Durval Dourado Neto, pela orientação, apoio e amizade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao agricultor Geildo, pela concessão da área onde foi realizado o experimento de campo e também pela generosa ajuda em vários momentos.

À BASF S.A., pela concessão da câmara de crescimento e de vários ingredientes ativos utilizados nos experimentos.

Ao Engenheiro Agrônomo Caio Augusto de C. G. Brunharo, pela parceria e imensa contribuição em todas as etapas dos experimentos.

Aos meus pais, pela ajuda nos seus dias de descanso.

Ao Professor Dr. Ricardo Antunes Azevedo, por conceder espaço, equipamentos e materiais para a realização das análises enzimáticas no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética (ESALQ-USP).

Ao Professor Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pela ajuda nas avaliações de trocas gasosas, por meio do aparelho IRGA.

À Engenheira Agrônoma Helena Chamma, pela grande contribuição no Laboratório de Sementes do Departamento de Vegetal (ESALQ-USP).

À Engenheira Agrônoma Berenice Kussumoto de Alcântara (M.Sc.), pela ajuda nas avaliações de atividade enzimática no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética (ESALQ-USP).

À Engenheira Agrônoma Karla Vilaça Martins (M.Sc.), pela amizade e contribuição em vários momentos.

À Luciane Aparecida Lopes Toledo e à Elisabete Sarkis São João, por atenderem minhas dúvidas e solicitações tão prontamente.

A minha família piracicabana, C’-ga Réga, pelos ensinamentos de vida e amizade.

A muitos outros que não cabem aqui no papel, mas sabem que contribuíram significativamente para que este trabalho fosse concluído, muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A cultura de soja.....	23
2.2 Fungicidas utilizados na cultura de soja.....	24
2.3 Efeitos fisiológicos causados por fungicidas.....	26
2.3.1 Atividade de enzimas antioxidantes	26
2.3.2 Alterações fotossintéticas	28
2.3.3 Metabolismo do nitrogênio.....	31
2.3.4 Alterações hormonais	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Experimento I: campo	35
3.1.1 Instalação e condução.....	35
3.1.2 Delineamento experimental e descrição dos tratamentos.....	36
3.1.3 Enzimas antioxidantes	37
3.1.4 Índice de área foliar e massa de matéria seca.....	39
3.1.5 Número de vagens na maturidade	40
3.1.6 Produtividade.....	40
3.1.7 Massa de 1000 grãos.....	41
3.1.8 Análise estatística	41
3.2 Experimento II: câmara de crescimento	41
3.2.1 Instalação e condução.....	41
3.2.2 Delineamento experimental e descrição dos tratamentos.....	42
3.2.3 Trocas gasosas e temperatura foliar.....	42
3.2.4 Análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Experimento I	43

4.1.1 Atividade de enzimas antioxidantes.....	43
4.1.4 Índice de área foliar	52
4.1.5 Massa de matéria seca.....	53
4.1.6 Número de vagens.....	57
4.1.7 Produtividade	58
4.1.8 Massa de 1000 grãos	59
4.2 Experimento II	59
4.2.1 Fotossíntese líquida.....	59
4.2.2 Respiração	60
4.2.3 Condutância estomática	61
4.2.4 Transpiração.....	62
4.2.5 Temperatura foliar	63
4.3 Considerações finais	64
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapíroxade, isolado e em mistura com Piraclostrobina, na cultura de soja

Além do controle de fungos fitopatogênicos, muitos fungicidas produzem efeitos fisiológicos positivos na planta, contribuindo para a melhoria da produtividade da cultura mesmo na ausência de doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar se o fungicida Fluxapíroxade, aplicado de forma isolada e em mistura com a Piraclostrobina, exerce algum efeito fisiológico na cultura de soja. Para tal, foram conduzidos dois experimentos (I - em campo e II - em câmara de crescimento), em blocos ao acaso, comparando seis tratamentos: [1] Testemunha, [2] Ciproconazol ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$), [3] Piraclostrobina ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$), [4] Fluxapíroxade ($50 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$), [5] Fluxapíroxade ($50 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$) + Piraclostrobina ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$) e [6] Piraclostrobina ($75 \text{ g.ha}^{-1} \text{ i.a.}$). No experimento I, os tratamentos foram aplicados em R_1 e $R_{5.1}$, sendo avaliadas(os): a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e catalase) no primeiro, quarto e sétimo dia após cada aplicação; o índice de área foliar aos 20 dias após cada aplicação; a massa de matéria seca de folha, haste e órgãos reprodutivos aos 20 dias após cada aplicação; o número de vagens por planta em R_6 , a produtividade e a massa de 1000 grãos. No experimento II, os tratamentos foram aplicados em V_7 e foram avaliadas: a fotossíntese líquida, a respiração, a condutância estomática, a transpiração e a temperatura foliar das plantas, um dia após a aplicação, por meio de um analisador infra-vermelho de gás (IRGA). Não foram observadas alterações no índice de área foliar, massa de matéria seca, respiração, transpiração, condutância estomática, temperatura foliar, número de vagens e massa de 1000 grãos para o tratamento Fluxapíroxade, tanto isolado como em mistura com a Piraclostrobina. Porém, a aplicação do Fluxapíroxade isolado reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e também a produtividade, embora tenha elevado a taxa fotossintética líquida. Em mistura com a Piraclostrobina, houve uma redução da atividade das enzimas antioxidantes, o que refletiu em uma tendência de prejuízo à produtividade. Por outro lado, o fungicida Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) apresentou maiores massa de matéria seca de flor, atividade das enzimas antioxidantes, taxa fotossintética líquida e produtividade, o que sugere uma atuação benéfica desse fungicida no metabolismo fotossintético e antioxidante da planta. Na dose de 100 g.ha^{-1} , entretanto, a Piraclostrobina reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e a produtividade, parecendo exercer efeito contrário àquele observado para a dose de 75 g.ha^{-1} , embora não tenha apresentado qualquer sintoma de fitotoxicidade.

Palavras-chave: Carboxamidas; Estrobilurinas; Triazóis

ABSTRACT

Physiological effects promoted by fungicide Fluxapyroxad, alone and mixed with Pyraclostrobin, in soybean

Beyond the control of plant pathogenic fungi, many fungicides produce positive physiological effects on plants, contributing to crop yield even in the absence of disease. The objective of this research is to verify if the fungicide Fluxapyroxad, alone and mixed with Pyraclostrobin, has a physiological effect on soybean. Two experiments were carried out (I – field and II – growth chamber), in a randomized block, comparing six treatments: [1] Control, [2] Ciproconazol ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$), [3] Pyraclostrobin ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$), [4] Fluxapyroxad ($50 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$), [5] Fluxapyroxad ($50 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$) + Pyraclostrobin ($100 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$) and [6] Pyraclostrobin ($75 \text{ g.ha}^{-1} \text{ a.i.}$). Experiment I was conducted with five replications and treatments were sprayed on the leaves, at stages R_1 and $R_{5.1}$. The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidase) was measured on the first, fourth and seventh day after each application. The leaf area index and the leaf, stem and flower/pod dry matter were measured 20 days after each application. The number of pods per plant, yield and weight of 1000 seeds were also measured. Experiment II was conducted with four replications and treatments were sprayed only at V_7 , due to limitation of space in the growth chamber. Net photosynthesis, respiration, stomatal conductance, transpiration and leaf temperature were measured one day after the application, by a “Infra-Red Gas analyser” (IRGA). No changes in leaf area index, dry matter, respiration, transpiration, stomatal conductance, leaf temperature, number of pods or weight of 1000 seeds were observed for the treatment Fluxapyroxad, neither alone nor in combination with Pyraclostrobin. The application of Fluxapyroxad alone reduced both the activity of antioxidant enzymes and yield, although net photosynthesis was increased. Fluxapyroxad + Pyraclostrobin reduced the activity of antioxidant enzymes and showed a tendency to reduce yield. Moreover, the treatment with Pyraclostrobin (75 g.ha^{-1}) was superior in terms of flower dry matter, antioxidant enzyme activity, net photosynthetic rate and yield, suggesting that this fungicide may have a positive effect on photosynthetic and antioxidative metabolism of the soybean plant. Pyraclostrobin (100 g.ha^{-1}), however, reduced antioxidant enzyme activity and yield, which suggests that an elevation in the Pyraclostrobin dose promotes the opposite effect of that observed for the recommended dose, although no phytotoxicity symptoms have appeared.

Keywords: Carboxamides; Strobilurins; Triazoles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Variação do índice de área foliar do milho (IAF, $\text{m}^2.\text{m}^{-2}$) em função do tempo (t, dias após a emergência). Fonte: Silva et al. (2011)	30
Figura 2 -	Variação da massa matéria seca total do milho (MST, $\text{kg}.\text{ha}^{-1}$) em função do tempo (t, dias após a emergência). Fonte: Von Pinho et al. (2009)	31
Figura 3 -	Valores médios da atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol}[\text{H}_2\text{O}_2].\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol (30 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) + Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 30,4%; 39,1% e 24,3%.....	44
Figura 4 -	Valores médios da atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol}[\text{H}_2\text{O}_2].\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) + Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 24,2%; 28,8% e 28,4%.....	45
Figura 5 -	Valores médios da atividade da superóxido dismutase (SOD, unidade $\text{SOD}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol (30 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) + Fluxapíroxade (50 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 $\text{g}.\text{ha}^{-1}$) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 19,9%; 21,6% e 12,0%.....	46

- Figura 6 - Valores médios da atividade da superóxido dismutase (SOD, unidade SOD.mg⁻¹ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 23,7%; 27,9% e 22,3% 47
- Figura 7 - Valores médios da atividade da guaiacol peroxidase (GPX, nmol.min⁻¹.mg⁻¹ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 23,1%; 33,6% e 22,3% 48
- Figura 8 - Valores médios da atividade da guaiacol peroxidase (GPX, nmol.min⁻¹.mg⁻¹ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 42,3%; 27,4% e 53,5% 48
- Figura 9 - Valores médios do índice de atividade enzimática (IAE, %) dos tratamentos: Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)] em relação ao tratamento Controle (Cont). As medições foram feitas no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 19,9%; 27,9% e 4,6% 50

- Figura 10 - Valores médios do índice de atividade enzimática (IAE, %) dos tratamentos: Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)] em relação ao tratamento Controle (Cont). As medições foram feitas no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 20,2%; 24,7% e 20,2% 51
- Figura 11 - Valores médios do índice de área foliar (IAF, m².m⁻²) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 43,0% 52
- Figura 12 - Valores médios do índice de área foliar (IAF, m².m⁻²) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 20,1% 52
- Figura 13 - Valores médios da massa de matéria seca de folha (MSF, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 37,3% 53
- Figura 14 - Valores médios da massa de matéria seca de haste (MSH, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 41,3% 53

- Figura 15 - Valores médios da massa de matéria seca de flor (MSFL, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 23,5% 54
- Figura 16 - Valores médios da massa de matéria seca total (MST, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 35,2% 55
- Figura 17 - Valores médios da massa de matéria seca de folha (MSF, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 21,4% 55
- Figura 18 - Valores médios da massa de matéria seca de haste (MSH, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 22,5% 56
- Figura 19 - Valores médios da massa de matéria seca de vagens (MSV, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 25,7% 56

- Figura 20 - Valores médios da massa de matéria seca total (MST, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 20,6% 57
- Figura 21 - Valores médios do número de vagens (NV, vagens.planta⁻¹) quando as plantas de soja se encontravam na maturidade plena, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 21,6% 57
- Figura 22 - Valores médios de produtividade (P, kg.ha⁻¹) de grãos de soja, a 13% de umidade, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 13,3% 58
- Figura 23 - Valores médios da massa de 1000 grãos de soja (M1000, g), a 13% de umidade, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 3,5% 59
- Figura 24 - Fotossíntese líquida (FL, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 15,23% 60

- Figura 25 - Respiração (R, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 53,4% 61
- Figura 26 - Condutância estomática (CE, $\text{mmol}[\text{H}_2\text{O}].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 25% 62
- Figura 27 - Transpiração (TR, $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 37,4% 63
- Figura 28 - Temperatura foliar (TF, °C), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 4,2% 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos tratamentos (T): (ingrediente ativo - dose, grupo químico e estágio fenológico - época das aplicações de fungicidas). Piracicaba, 2013-2014.....	37
------------	--	----

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido crescente a pesquisa com fungicidas que, além de exercerem o controle de doenças, causam efeitos fisiológicos na planta, isto é, contribuem para o crescimento vegetal mesmo quando aplicados em plantas não infectadas por patógenos. Alguns resultados desta pesquisa são os fungicidas Piraclostrobina (133 g.L^{-1}) + Epoxiconazol (50 g.L^{-1}) e Piraclostrobina (260 g.L^{-1}) + Epoxiconazol (160 g.L^{-1}), cujas propriedades fisiológicas estão registradas na bula dos respectivos produtos comerciais.

O presente trabalho aborda a descoberta de uma nova molécula fungicida, o Fluxapiroxade, que foi recentemente registrado na dose de 50 g.ha^{-1} i.a. em mistura com Piraclostrobina na dose de 100 g.ha^{-1} i.a. O fungicida é recomendado em pulverização foliar para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), do ‘crestamento foliar’ ou ‘mancha púrpura da semente’ (*Cercospora kikuchii*) e da septoriose ou mancha parda (*Septoria glycines*) da soja.

A descoberta de uma molécula nova com ação fungicida é resultado de um trabalho de pesquisa e estudo prévio de cerca de 10 anos (média da maioria das empresas de defensivos químicos). Segundo Rodrigues et al. (2007), a aplicação repetitiva de um mesmo fungicida ou de fungicidas de um mesmo grupo químico exerce uma pressão de seleção na população de fungos existentes, facilitando o desenvolvimento de resistência. Por isso, é muito importante a descoberta de moléculas novas, com modos de ação diferentes, para se fazer a rotação de fungicidas na lavoura, evitando o surgimento de populações fitopatogênicas resistentes.

O surgimento de uma nova molécula no mercado representa um avanço na área da fitopatologia e um campo a ser explorado pela fisiologia. Desconhecendo-se a fundo o modo de ação do Fluxapiroxade, investiga-se a possibilidade de este fungicida provocar mudanças na fisiologia vegetal de tal forma a alterar significativamente o metabolismo e a produção das plantas independentemente da presença de doença, assim como já foi comprovado para várias moléculas do grupo das estrobilurinas. A Piraclostrobina aplicada em plantas de soja, por exemplo, independentemente do controle das doenças, aumentou a fotossíntese líquida da planta, a atividade da enzima nitrato redutase e de uma gama de enzimas antioxidantes, a massa de matéria seca da planta, a produtividade e a qualidade dos grãos (RODRIGUES, 2009). Embora o modo de ação fisiológica dos fungicidas ainda não esteja totalmente elucidado, não se pode negar o efeito

positivo que eles causam no crescimento vegetal, o que fica claro com os incrementos em produtividade relatados em quase todos os trabalhos relacionados ao assunto.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as características de crescimento (índice de área foliar e massa de matéria seca), metabolismo (atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, fotossíntese líquida, respiração, transpiração, condutância estomática e temperatura foliar), produção (número de vagens e produtividade) e qualidade da produção (massa de 1000 grãos) da cultura da soja sob a ação do fungicida Fluxapirroxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na ausência de doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura de soja

De acordo com o sexto levantamento da safra brasileira de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento, a área plantada de grãos em 2013/2014 é estimada em 55,40 milhões de hectares, o que representa um aumento de 2,11 milhões de hectares em relação à safra anterior (2012/2013), ou seja, 4,0% de acréscimo. A cultura da soja ocupa o primeiro lugar em área plantada. A estimativa é de que a safra brasileira de soja alcance uma produção de 85,4 milhões de toneladas, representando um incremento de 4,8% em relação à safra 2012/2013. Isto é resultado de um crescimento de 7,4% na área e uma redução prevista na produtividade de 2,4%. A maior área semeada de soja se encontra na Região Centro-Oeste - 13.811.900 hectares e apresenta uma produtividade média de 2.989 kg.ha⁻¹, um pouco acima da média brasileira, que é de 2.867 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2014).

O interesse pela cultura de soja está na qualidade dos seus grãos, cuja composição apresenta em média de 37 a 42% de proteína e 18 a 21% de óleo, dependendo do genótipo da semente e das condições de cultivo (BONATO et al., 2000). Da soja produzida no Brasil, 40% são exportados em grãos, principalmente para a Europa e a China. Os outros 60% são esmagados: cerca de 20% é transformado em óleo - utilizado de a forma direta ou como ingrediente em inúmeros produtos como chocolates, biscoitos, margarina, temperos e pães, 77% é transformado em farelo e o restante é destinado a outras formas de alimentação. Aproximadamente 80% do óleo de soja produzido no Brasil são destinados ao mercado interno (CASTILLO; VENCOVSKY, 2004).

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertence à família *Fabaceae*, portanto é uma dicotiledônea. A produtividade potencial da cultura de soja já foi estimada por vários autores, alcançando valores de 10 t.ha⁻¹ (VENTIMIGLIA et al., 1999) a 15 t.ha⁻¹ (PIRES et al., 2000). A vasta diferença entre os valores de produtividade potencial e real da soja se justifica pela presença de vários fatores limitantes no ambiente de produção: os abióticos (luz, temperatura, água, nutrientes, população de plantas) e os bióticos (plantas daninhas, doenças e pragas). Entre as doenças na cultura da soja, as principais são aquelas causadas por fungos. Mesmo com o uso de defensivos, as perdas anuais devido à incidência de fungos na soja vão de 15 a 20%, em média (EMBRAPA, 2014).

As principais doenças fúngicas que atacam a planta de soja são o oídio (*Microsphaera diffusa*), o míldio (*Peronospora manshurica*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis*), a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), a mancha parda (*Septoria glycines*), o crestamento foliar de *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*), a mancha "olho-de-rã" (*C. sojae*), a podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*) e, a principal delas, a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) (YORINORI et al., 2002; YORINORI; NUNES JUNIOR; LAZZAROTTO, 2004). A utilização de fungicidas na cultura da soja sofreu um grande aumento em 2001, quando a ferrugem asiática foi introduzida nas Américas. Além do uso de fungicidas, há também outras práticas eficientes no controle das doenças, como o uso de variedades precoces e resistentes ou o plantio de populações adequadas para evitar um longo período de molhamento foliar que favoreça o desenvolvimento do fungo.

2.2 Fungicidas utilizados na cultura de soja

Dos fungicidas registrados para soja no Brasil, os mais usados, antes da comercialização do Fluxapiroxade, pertenciam a um dos três grupos químicos: benzimidazóis, triazóis ou estrobilurinas (AGROFIT, 2014).

Os benzimidazóis atuam de forma sistêmica e incluem os princípios ativos Carbendazim, Tiofanato-metílico e Tiabendazol. Possuem um amplo espectro de ação, abrangendo o oídio, a antracnose e a cercosporiose. São muito utilizados no tratamento de sementes, garantindo um estande adequado de plantas, mesmo com a semeadura coincidindo com períodos de estiagem (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009). O sítio de ação dos benzimidazóis é a β -tubulina, uma proteína que se une a outra, a α -tubulina, para formar os microtúbulos, que compõem o citoesqueleto das células. Uma das principais funções do microtúbulo é no deslocamento de cromossomos no processo de divisão celular, a mitose. Portanto, os benzimidazóis atuam inibindo a formação dos microtúbulos e, como resultado, as células não se dividem e passam a ser multinucleadas, levando o fungo à morte (DAVIDSE, 1986). Os benzimidazóis foram introduzidos para uso em diversas culturas na década de 60, porém, devido ao seu intenso uso tornaram-se muito persistentes no solo e na água, com uma meia-vida de 25 meses em condições anaeróbias (COUTINHO et al., 2006). Assim, com o surgimento dos triazóis, foi possível uma melhor diversificação dos produtos usados na soja.

Os triazóis, também chamados de inibidores da biossíntese de esteróis, controlam um amplo espectro de doenças causadas por ascomicetos, basidiomicetos e fungos anamórficos, não

tendo atuação sobre oomicetos como *Pythium* e *Phytophthora*, já que esses não sintetizam esteróis. Incluem os princípios ativos Ciproconazol, Propiconazol, Tebuconazol, Epoxiconazol, Difeconazol e Bromuconazol. Entre as doenças controladas na soja, estão a ferrugem asiática, o crestamento foliar, a mancha parda e o oídio. O modo de ação dos triazóis é a interrupção da primeira etapa do processo de biossíntese dos ergosteróis, por meio da ocupação de um sítio ativo, localizado no citocromo P-450, destinado à ligação da enzima 14 α -demetilase. Dessa forma, ocorre um acúmulo de produtos intermediários do processo e não há a formação do ergosterol, que é um componente da membrana celular dos fungos, exercendo funções semelhantes às do colesterol em células animais. A ausência dos ergosteróis causa uma desorganização da estrutura celular, induzindo a formação de membranas alternativas. Com doses elevadas de fungicida, observa-se dano direto sobre a membrana assim como alterações morfológicas. Estas alterações se caracterizam por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular e a formação de inclusões membranosas (FORCELINI, 1994; TOMLIN, 2002). A maior vantagem do triazóis é que os fungos dificilmente tornam-se resistentes a esse grupo de moléculas e, quando apresentam certa resistência, essa normalmente vem acompanhada de uma dificuldade de adaptação do biótipo ao ambiente (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

As estrobilurinas foram biossintetizadas a partir de um metabólito secundário produzido pelo fungo *Strobilurus tenacellus* e por isso são assim chamadas. Este grupo começou a ser comercializado como fungicida em 1996, sendo amplamente usado de forma isolada e em mistura com os triazóis (RODRIGUES, 2006). As estrobilurinas agem inibindo o transporte de elétrons no complexo 3 mitocondrial, portanto, inibindo a respiração dos fungos e, conseqüentemente, a formação de ATP. Elas possuem um amplo espectro de ação, que abrange ascomicetos, fungos anamórficos, alguns basidiomicetos e alguns oomicetos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Entre as doenças controladas na soja, estão a ferrugem asiática, o oídio e as doenças de final de ciclo (*Septoria glycines*, *Cercospora kikuchii* e *Corynespora cassiicola*). As estrobilurinas atuam tanto preventivamente, inibindo a germinação de esporos, como de forma curativa e erradicante, bloqueando o desenvolvimento dos fungos nos primeiros estádios após a germinação, além de possuir atividade antiesporulante (VENANCIO et al., 1999). As principais moléculas do grupo são a Azoxistrobina, a Piraclostrobina e a Trifloxistrobina.

O ingrediente ativo Fluxapiroxade pertence ao grupo químico das carboxamidas, que foi um dos primeiros grupos de ação sistêmica a ser descoberto. As primeiras moléculas deste grupo eram seletivas para doenças causadas por basidiomicetos e seu estreito espectro de fungitoxicidade incluía carvões, cáries, ferrugens e *Rhizoctonia solani* (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Porém, os fungicidas deste grupo praticamente deixaram de ser usados com o surgimento de moléculas de grupos químicos com maior espectro de ação, como os benzimidazóis (afetam o processo de mitose), depois os triazóis (afetam a biossíntese de esteróis), seguidos das estrobilurinas (afetam a respiração). Recentemente, com a descoberta da molécula Fluxapiroxade, pertencente às carboxamidas, esse grupo volta a ser objeto de estudo. Semelhante às estrobilurinas, as carboxamidas atuam na respiração mitocondrial dos fungos, com a diferença que essas atuam no complexo 2 da cadeia de transporte de elétrons, também chamado de complexo succinato-desidrogenase. Esse complexo utiliza o aceptor de elétrons FAD para efetuar a transferência de elétrons de FADH_2 para a Coenzima Q. Assim, a inibição desse processo resulta no bloqueio da produção de ATP, além da formação de várias moléculas intermediárias prejudiciais à célula. Os principais princípios ativos do grupo são a Carboxina, a Oxicarboxina e o Fluxapiroxade. A Carboxina tem uma alta fungitoxicidade porém é bastante instável no organismo do fungo, sendo rapidamente oxidada em sulfóxido, composto não fungitóxico. A Oxicarboxina, por sua vez, apresenta menor fungitoxicidade mas alta persistência no interior do fungo, permanecendo estável por mais tempo e, portanto produz um controle mais eficiente que a Carboxina. Os estudos com o Fluxapiroxade mostram bons resultados no controle de *Corynespora cassiicola* (TERAMOTO et al., 2012), além de *Phakopsora pachyrhizi*, *Cercospora kikuchii* e *Septoria glycines*, que constam na bula da mistura Fluxapiroxade + Piraclostrobina.

2.3 Efeitos fisiológicos causados por fungicidas

2.3.1 Atividade de enzimas antioxidantes

Enzimas antioxidantes estão presentes no organismo vegetal com a função de combater os radicais livres, como o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$). A presença desses radicais na planta é nociva, podendo inativar enzimas, danificar componentes celulares, células e tecidos devido a sua ação tóxica e mutagênica. Os radicais livres são formados naturalmente e continuamente no metabolismo aeróbico, como nas reações fotoquímicas da fotossíntese e no processo respiratório, pois o

oxigênio tem a capacidade de agir como um redutor parcial nas reações de oxidorredução, representando uma constante ameaça ao organismo vegetal. Além disso, em situações de estresse, tanto biótico quanto abiótico, a concentração desses radicais é aumentada, exigindo que a atividade das enzimas antioxidantes também se eleve (ROLÃO, 2010; TIMBÓ, 2013; AZEVEDO et al., 1998). Entre as principais enzimas antioxidantes que atuam no organismo vegetal, estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a guaiacol peroxidase (GPX).

A SOD pode ser encontrada sob três formas: (i) aquela contendo cobre e zinco (CuZnSOD), encontrada no citoplasma, cloroplasto, peroxissomo e apoplasto; (ii) aquela contendo ferro (FeSOD), encontrada no cloroplasto e às vezes no peroxissomo e (iii) aquela contendo manganês (MnSOD), encontrada no cloroplasto e mitocôndria (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). A SOD atua na primeira etapa da defesa, catalisando a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, de acordo com a eq. (1):

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado ainda precisa ser eliminado em etapas posteriores, que serão realizadas pela CAT e GPX. A CAT está presente em todas as células de plantas, animais e microrganismos aeróbios, catalisando a oxirredução do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (SCANDALIOS, 1990). Em baixas concentrações de H_2O_2 , a CAT oxida uma molécula contendo o radical H_2 (RH_2), que pode ser, por exemplo, uma molécula de etanol ou ácido ascórbico [eq. (2)]. Em altas concentrações do substrato, a CAT utiliza apenas o H_2O_2 , que faz a função dupla de doador e receptor de oxigênio, para que a reação seja acelerada [eq. (3)]. A CAT é uma enzima altamente eficiente nesse processo de decomposição, não sendo facilmente saturada pelo H_2O_2 (SCANDALIOS, 2005).

A GPX atua da mesma forma que a CAT, porém não é capaz de decompor o H_2O_2 sozinho. A reação catalisada pela GPX também é representada pela eq. 3, sendo que o radical R, nesse caso, é o guaiacol. A GPX faz parte de um amplo grupo, as peroxidases, cujo modo de ação é o mesmo, mas cada uma oxida um radical específico. Por exemplo, enquanto a GPX decompõe o H_2O_2 mediante a presença de guaiacol, a ascorbato peroxidase decompõe o H_2O_2 mediante a presença do ascorbato (MIKA; LUTHJE, 2003). Sendo assim, a atividade das enzimas antioxidantes e, principalmente, o equilíbrio entre as atividades da SOD e da CAT ou GPX é

essencial para conter os radicais livres no organismo, permitindo o desenvolvimento pleno da planta (MITTLER, 2002).

É nesse contexto, considerando o sistema antioxidante da planta, que muitos autores relacionaram a atividade das enzimas antioxidantes com a aplicação de alguns fungicidas. Wu e Von Tiedemann (2001) estudaram o processo de senescência da planta de trigo pulverizada com o fungicida Azoxistrobina (grupo químico das estrobilurinas), sob condições controladas em casa de vegetação. Os autores observaram que o processo de senescência era acompanhado de uma diminuição nos níveis de SOD e de uma concomitante elevação do teor de superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Porém, nas plantas tratadas com Azoxistrobina, os níveis de SOD mantiveram-se altos por mais tempo e também foi identificada uma elevação na concentração de peróxido de hidrogênio, comparando com plantas não tratadas no mesmo estágio fenológico. Isso indica que ocorreu um atraso significativo na senescência dessas plantas, principalmente daquelas tratadas precocemente, e, por consequência, apresentaram maiores produtividades.

Amaro (2011) realizou um experimento em casa de vegetação com plantas de pepino enxertado e pé franco para avaliar o efeito fisiológico de alguns fungicidas. As atividades de CAT, SOD e peroxidases foram incrementadas na maioria dos tratamentos fungicidas, principalmente naquele com Piraclostrobina+Boscalida, e esse efeito positivo foi refletido em maiores produtividades.

Lacerda (2014), avaliando plântulas de soja cujas sementes foram tratadas com diferentes fungicidas, também constatou que aquelas tratadas com Fluxapiraxade, Piraclostrobina e Fipronil + Piraclostrobina + Tiofanato Metílico apresentaram maiores atividades de CAT quando comparadas com as plântulas sem tratamento.

2.3.2 Alterações fotossintéticas

Outro efeito fisiológico de alguns fungicidas que foi observado por muitos autores está no sistema de trocas gasosas da planta. Eles observaram alterações significativas no balanço fotossintético de plantas tratadas. Fagan et al. (2010) aplicaram os fungicidas Tebuconazol (triazol) e Piraclostrobina (estrobilurina) em plantas de soja no estágio R_1 e $R_{5.1}$ e constataram uma imediata elevação da taxa fotossintética das plantas tratadas com Piraclostrobina, que apresentaram taxas 10% mais elevadas que o tratamento com Tebuconazol apenas 3 horas após a primeira aplicação. Sete dias depois, essa diferença foi de 17% a mais que o tratamento com triazol e 56% em relação à Testemunha. Eles observaram também que o tratamento com

Piraclostrobina promoveu uma redução nos níveis de respiração das plantas, desde o primeiro até o 17º dia após a primeira aplicação. O mesmo comportamento foi repetido após a segunda aplicação, com elevações na taxa fotossintética e reduções na respiração das plantas tratadas com Piraclostrobina. Essas alterações foram percebidas na produtividade dos grãos, que foi significativamente maior no tratamento com a estrobilurina.

Corroborando com os resultados de Fagan et al. (2010), Giuliani et al. (2011) constataram que plantas de tomate isentas de doença responderam positivamente à aplicação do fungicida Azoxistrobina, quando em condições de estresse hídrico. As plantas tratadas apresentaram melhor eficiência no uso da água, calculada pela razão entre a fotossíntese líquida ($\mu\text{mol}[\text{CO}_2].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a taxa transpiratória ($\text{mmol}[\text{H}_2\text{O}].\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), resultando em uma produtividade mais alta que o tratamento Controle.

Martins (2011), comparando a mistura Piraclostrobina+Epoxiconazol com o Epoxiconazol, verificou que a mistura aplicada em plantas de soja no estágio fenológico R₂ elevou a fotossíntese líquida e a taxa transpiratória das folhas em relação ao tratamento com o triazol isolado. Essas diferenças foram observadas tanto para as folhas do estrato superior quanto para as folhas do estrato inferior da planta.

Plantas de feijão tratadas com Piraclostrobina na dose de 0,3 L.ha⁻¹ em R₅ e R₇ também apresentaram médias fotossintéticas maiores que o tratamento controle em situação de estresse hídrico. Esse resultado foi refletido em uma maior produtividade de grãos, sugerindo que a Piraclostrobina auxilia na superação do estresse fotossintético causado pela deficiência hídrica, a favor da manutenção da produção (JADOSKI, 2012).

As estrobilurinas atuam na respiração mitocondrial dos fungos, mais precisamente no complexo III mitocondrial, inibindo a transferência de elétrons do citocromo b para o citocromo c1 (VON JAGOW; LINK, 1986). Segundo Köhle et al. (1994), a atuação fisiológica das estrobilurinas está provavelmente relacionada com o seu modo de ação fungitóxica. A seletividade das estrobilurinas depende mais das reações de defesa do fungo (por meio da bipartição da molécula fungicida ou da sua degradação metabólica, por exemplo, impedindo-a de alcançar o seu sítio alvo) do que de uma ligação específica entre o complexo mitocondrial do fungo e a molécula fungicida (KÖHLE et al., 1994). Desta forma, pode-se esperar também que a estrobilurina atinja a mitocôndria da célula vegetal, interferindo, ao menos parcialmente, no seu processo respiratório, o que poderia beneficiar a fotossíntese líquida da planta e,

consequentemente, potencializar a assimilação de carbono e nitrogênio (RODRIGUES, 2009). Cabe salientar que uma redução temporária da respiração pode não significar fitotoxicidade, dependendo da importância da respiração mitocondrial para o suprimento de energia, a qual varia dependendo da fenologia da planta e das condições ambientais (SAUTER et al., 1995).

Por outro lado, a respiração é um fator preponderante no metabolismo da planta. Teoricamente, a respiração tem sido separada em respiração de crescimento e de manutenção. A respiração de crescimento concorre para a síntese de nova biomassa e é proporcional à taxa fotossintética líquida, enquanto a de manutenção concorre para a reciclagem de compostos já existentes e é maior quanto maior for a biomassa vegetal (ROBSON, 1973; HAY; WALKER, 1989; KRAUSS; WILSON; ROBSON, 1989). Mesmo considerando que a importância da respiração depende da fenologia da planta como salientado por Sauter et al. (1995), deve-se ressaltar que a aplicação de fungicidas é geralmente realizada nos estádios em que o metabolismo e o crescimento da planta é mais intenso (florescimento e enchimento de grãos), como mostram as Figuras 1 e 2. Nesses períodos, a respiração de crescimento é alta, concorrendo para o aumento de biomassa que, por sua vez, eleva a respiração de manutenção.

Figura 1 - Variação do índice de área foliar do milho (IAF, $m^2.m^{-2}$) em função do tempo (t, dias após a emergência).
Fonte: Silva et al. (2011)

Figura 2 - Variação da massa matéria seca total do milho (MST, kg.ha⁻¹) em função do tempo (t, dias após a emergência). Fonte: Von Pinho et al. (2009)

2.3.3 Metabolismo do nitrogênio

O foco das pesquisas que citam o o metabolismo do nitrogênio como principal efeito fisiológico dos fungicidas é a atividade da nitrato redutase. Ela é encontrada no citoplasma das folhas, onde catalisa o primeiro estágio da assimilação do nitrato, reduzindo-o a nitrito. Este depois será reduzido em amônio, com a ação da nitrito redutase, encontrada nos cloroplastos, e o amônio é em seguida incorporado aos aminoácidos que formarão as proteínas vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outras formas de se avaliar a presença do N nas plantas é, diretamente, pela quantificação do nutriente nas folhas e, indiretamente, pelo teor de clorofila estimado pelo índice SPAD, que mensura a cor verde refletida pelos tecidos fotossintéticos.

Fagan (2007) avaliou no campo a atividade da nitrato redutase em plantas de soja pulverizadas com Piraclostrobina e com Tebuconazol, nos estádios R₁ e R_{5.1}. Ele observou que o tratamento com a estrobilurina mostrou maior atividade da enzima alguns dias após as aplicações. A resposta enzimática foi mais rápida em R₁, em que as diferenças se mostraram significativas já no primeiro dia após a aplicação, enquanto isso só aconteceu aos seis dias após a segunda aplicação (R_{5.1}). Além disso, a produtividade do tratamento com Piraclostrobina foi, em média, 4 sacas.ha⁻¹ superior ao tratamento com Tebuconazol.

Lima, Moraes e Silva (2012) conduziram um experimento com mudas de bananeira e verificaram que a área foliar, a atividade da nitrato redutase, o teor de clorofila (índice SPAD) e o

teor de nitrogênio total das plantas tratadas com Piraclostrobina foi levemente superior em relação às tratadas com Azoxistrobina, que, por sua vez, apresentaram resultados bastante superiores às do tratamento Testemunha.

Plantas de melão rendilhado aplicadas tanto com Piraclostrobina isolada, Boscalida isolada e com a mistura Boscalida+Piraclostrobina apresentaram maiores valores do índice SPAD quando comparadas com plantas aplicadas com Azoxistrobina ou sem aplicação, aos 44 dias após a pulverização. Quanto à atividade da nitrato redutase, a mistura Boscalida+Piraclostrobina apresentou maior atividade da enzima que o tratamento Controle e o tratamento com Azoxistrobina, aos 22 e aos 43 dias após a aplicação (MACEDO, 2012).

2.3.4 Alterações hormonais

Os hormônios vegetais são reguladores químicos internos e atuam sobre a divisão, alongação e diferenciação celular. De um modo geral, as auxinas, citocininas e giberelinas são promotoras do crescimento, enquanto o etileno e o ácido abscísico (ABA) estão relacionados à fase de senescência da planta. Além disso, o etileno também está associado a situações de estresse, tendo sua produção induzida em caso de lesão, alagamento, seca, doenças e temperaturas extremas, por exemplo (TAIZ; ZEIGER, 2009). Por isso, alguns autores se baseiam nas alterações hormonais para explicar os efeitos fisiológicos produzidos por fungicidas.

Em experimento realizado com plantas de soja das variedades cultivadas M8008RR e M7878RR, avaliou-se a atividade das citocininas (zeatina e isopentinil-adenina), auxina (ácido indolbutírico) e giberelinas (GA_3). As plantas tratadas com Piraclostrobina + Epoxiconazol apresentaram maiores conteúdos de citocininas, auxina e giberelinas que aquelas tratadas com Tebuconazol e aquelas sem tratamento. Em outro experimento realizado com plantas de soja das variedades cultivadas Conquista, CD-208 e M-7501, avaliou-se o teor de etileno. As plantas que receberam pelo menos uma aplicação do fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazol apresentaram menores teores de etileno em relação aos tratamentos Testemunha e outros que não continham o princípio ativo Piraclostrobina. Em ambos os experimentos, foram observadas maiores produtividades nos tratamentos contendo a Piraclostrobina (RODRIGUES, 2009).

Grossmann, Kwiatkowski e Gaspar (1999) estudaram as mudanças hormonais em plantas e discos foliares de trigo, entrando na fase de senescência, tratados com diferentes doses da estrobilurina Kresoxim-metil. Eles observaram que as plantas tratadas tiveram decréscimos nos

níveis de etileno e acréscimos nos níveis de citoquininas, resultando em um atraso na senescência dessas plantas.

Diaz-Espejo et al. (2012) realizaram experimentos com videiras totalmente livres de doenças e pulverizadas com Metiram + Piraclostrobina. As plantas tratadas não apresentaram diferenças com relação à Testemunha quanto à condutância estomática das folhas, potencial osmótico da folhas e qualidade das uvas. Porém, a concentração foliar de ABA se elevou no primeiro dia após a aplicação e, em seguida, foi reduzida até que no terceiro dia já não havia diferença com o tratamento Testemunha. Além disso, as plantas tratadas com Metiram + Piraclostrobina apresentaram valores superiores de componentes da produção. Segundo os autores, o efeito da estrobirulina é de mimetizar um leve estresse hídrico na planta, causando um efeito positivo na eficiência do uso da água e na produtividade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I: campo

3.1.1 Instalação e condução

O experimento foi instalado em uma propriedade rural localizada no município de Rio das Pedras, SP (22,83° de latitude Sul, 47,60° de longitude Oeste e 541 m de altitude). O solo é classificado como Latossolo vermelho distrófico argiloso. O clima do local pertence ao tipo Cwah – tropical de altitude com estiagem de inverno segundo a classificação de Köppen (1948). Nesta região a precipitação média anual é de 1257 mm, com temperatura média anual em torno de 21,4°C.

O experimento foi conduzido em campo, em condições de sequeiro, entre os meses de outubro de 2013 a fevereiro de 2014. A variedade cultivada de soja Apollo RR, foi semeada por meio de uma semeadora-adubadora no dia 6 de outubro de 2013. Antes da semeadura, as sementes foram tratadas com o fungicida Carboxina + Thiram (200 + 200 g.L⁻¹) na dose de 250 mL para cada 100 kg de sementes e depois inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* (5,0 x 10⁹ de células viáveis por g) na dose de 200 g a cada 50 kg de semente. Foram semeadas 19 sementes por metro em um espaçamento entrelinhas de 0,45 m, para o estabelecimento de uma população final de 400.000 plantas por hectare. A adubação de base foi de 300 kg.ha⁻¹ da formulação NPK 04-20-20, o que totalizou uma adição ao solo de 12, 60 e 60 kg.ha⁻¹ de N, P e K, respectivamente. Durante todo o período do experimento, foi feito um rigoroso manejo de plantas daninhas e pragas. O manejo de plantas daninhas foi realizado por meio de duas aplicações sequenciais de Glifosato + Cletodim, quando as plantas estavam no estágio V₄. O manejo de pragas foi feito com a aplicação dos inseticidas: Diamida Antranílica em V₄ e V₆, Imidacloprido + Beta-ciflutrina em R_{5.1} e R_{5.2}, Tiametoxam + Lambda-cialotrina em R_{5.3} e R_{5.4}.

Para melhor caracterização dos efeitos dos tratamentos, a fenologia da soja e a severidade de doenças foram acompanhadas, semanalmente, durante todo o ciclo da soja. Para a avaliação da severidade de doenças foi tomada uma amostra de dez plantas ao acaso por parcela. Foi utilizada a escala diagramática apresentada por Azevedo e Leite (1995), a qual mostra níveis de sintomas de 0 a 5, onde: 0= ausência de sintoma; 1= 10% da área foliar da planta com sintoma da doença; 2=

20% da área foliar afetada; 3= 60% da área foliar atacada; 4= 80% da área foliar atacada; 5= 100% da área foliar com sintoma da doença. Durante todo o ciclo da cultura, os sintomas de doença não atingiram o nível 1, ou seja, praticamente não houve a interferência de doenças, o que favoreceu muito o objetivo do experimento. A colheita da soja foi realizada no dia 6 de fevereiro de 2014.

3.1.2 Delineamento experimental e descrição dos tratamentos

Cada parcela foi representada por oito linhas de 7 m de comprimento, sendo considerado como bordadura a linha lateral de cada extremidade e 0,5 m da frente e do fundo da parcela, totalizando 25,2 m² de área total e 13,5 m² de área útil. O delineamento experimental foi constituído em blocos casualizados, contendo cinco repetições e seis tratamentos: [1] Testemunha; [2] Ciproconazol (100 g.ha⁻¹ i.a.); [3] Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹ i.a.); [4] Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹ i.a.), [5] Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹ i.a.) + Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹ i.a.) e [6] Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹ i.a.). O tratamento [1] representou a Testemunha Absoluta, em que poderia haver a interferência de doenças; o [2] representou a Testemunha Relativa, em que não haveria a interferência de doenças e não haveria efeito fisiológico; o [3] e o [4] representaram os ingredientes ativos contidos na mistura Piraclostrobina e Fluxapiroxade, de forma isolada e nas doses correspondentes àquelas da mistura; o [5] representou a mistura recentemente registrada como fungicida e o [6] representou a Testemunha Positiva, isto é, a Piraclostrobina isolada na sua dose recomendada, em que se esperava haver efeito fisiológico. As aplicações dos fungicidas foram realizadas nos estádios R₁ e R_{5.1}, por meio de um pulverizador costal, trabalhando a uma pressão constante e pressurizado com CO₂. A Tabela 1 apresenta a descrição dos tratamentos.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos (T): (ingrediente ativo - dose, grupo químico e estágio fenológico - época das aplicações de fungicidas). Piracicaba, 2013-2014

T	Ingrediente ativo (g.ha ⁻¹)	Grupo químico	Estádio fenológico
1	Testemunha	-	-
2	Ciproconazol (30)	triazol	R ₁ e R _{5.1}
3	Piraclostrobina (100)	estrobilurina	R ₁ e R _{5.1}
4	Fluxapiroxade (50)	carboxamida	R ₁ e R _{5.1}
5	Fluxapiroxade (50) +Piraclostrobina (100)	carboxamida +estrobilurina	R ₁ e R _{5.1}
6	Piraclostrobina (75)	estrobilurina	R ₁ e R _{5.1}

Todas as avaliações foram feitas considerando as plantas da área útil da parcela, ou seja, aquelas posicionadas nas seis linhas centrais, descartando-se 0,5 m no fundo e na frente da parcela.

3.1.3 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX foram determinadas no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos, repetindo esta sequência após a segunda aplicação. Foi coletado o trifólio mais novo totalmente expandido de três plantas em cada parcela. Manualmente, separou-se os folíolos de cada um dos três trifólios, sendo que o conjunto dos nove folíolos formavam uma amostra representativa de uma parcela. Cada amostra foi embrulhada em papel alumínio, devidamente identificada, e imediatamente congelada em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer com temperatura constante de -80°C.

Anteriormente à determinação da atividade das enzimas, fez-se a extração e a quantificação de proteína contida em cada amostra, visto que os valores de atividade enzimática são dados em função da quantidade de proteína da amostra. A extração foi feita pesando 1 g dos folíolos congelados e macerando-os em cadinho juntamente com nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 0,04 g de polivinilpirrolidona (PVPP) e 5 mL do tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5. A solução obtida no cadinho foi filtrada em papel e colocada em um tubo de plástico para ser centrifugada a 10.000 RPM, a 4°C, por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante contido no tubo foi transferido para um ependorf, sendo essa a amostra vegetal extraída, que foi utilizada em todas as determinações. Toda a operação de extração foi feita a 4°C. A quantificação

de proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (1976), a 25°C. Primeiro, foi feita uma curva padrão de concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA) através de regressão linear. Segundo, para o preparo das amostras, foi pipetado em cubetas de plástico: 1 mL do reagente Bradford e 20 µL da amostra vegetal extraída. Para cada amostra representativa de uma parcela, foram preparadas três cubetas. Em uma cubeta, preparou-se o que é chamado de ensaio "branco", em que não é colocado a amostra vegetal extraída, portanto, foi pipetado apenas 1 mL do reagente Bradford e 20 µL de água destilada. O valor de absorbância do branco é usado comparativamente em todas as amostras. Ao final, agitou-se todas as cubetas com a ajuda de um vortex e, em seguida, leu-se a absorbância delas em espectrofotômetro, a 595 nm. Os valores de concentração de proteínas foram obtidos através da interpolação dos dados na curva padrão.

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Azevedo et al. (1998). O ensaio foi realizado em cubetas de quartzo, a 25°C. Primeiro, preparou-se a solução tampão, pela adição de 20 mL do tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 a 50 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Essa solução tampão foi mantida no escuro em banho maria a 25°C durante todo o ensaio enzimático. Para o preparo do branco, foi colocado 1 mL da solução tampão na cubeta e, para o preparo das amostras, acrescentou-se 25 µL da amostra vegetal extraída à mesma quantidade de tampão. Para cada amostra representativa de uma parcela, foram preparadas três cubetas. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 240 nm, em intervalos de 1 segundo, durante 1 minuto para cada amostra. O valor de absorbância liberado é a diferença entre a absorbância lida no tempo 0 min e aquela lida no tempo 1 minuto, sendo os valores ajustados por uma equação de regressão linear. Quanto maior a diferença entre as absorbâncias inicial e final, maior a quantidade de peróxido de hidrogênio consumido. A atividade da CAT foi dada em µM de H₂O₂ consumidos por minuto por mg de proteína.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo o método descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Primeiramente, foi preparada a solução tampão por meio da adição de 114,72 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; 50,7 mL de metionina 50 mM; 14,62 mL de nitroblue tetrazolium (NBT) 1 mM; 1,95 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM e 9,75 mL de riboflavina 0,1 mM, o que resultou em uma solução contendo tampão fosfato de sódio 50 mM; metionina 13 mM; NBT 75 µM; EDTA 0,1 mM e riboflavina 5 µM. Essa solução tampão foi mantida no escuro em banho maria a 25°C durante todo o ensaio enzimático. Em seguida, foram preparados dois brancos, adicionando-se 2.950 µL da solução tampão em cada

um, em tubos de vidro. Para o preparo das amostras, acrescentou-se, em tubos de vidro, 50 μL da amostra vegetal extraída aos 2.950 μL da solução tampão. Para cada amostra representativa de uma parcela, foram preparadas três cubetas. Os tubos contendo as amostras juntamente com o branco A foram imediatamente colocados sob a incidência direta de luz, enquanto o branco B ficou totalmente protegido de luz. Após 5 minutos, a luz foi apagada e as soluções foram transferidas dos tubos de vidro para cubetas de plástico e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 560 nm. O valor de absorbância do branco B foi usado comparativamente em todas as amostras e a absorbância do branco A foi utilizada para o cálculo da atividade, que foi dada em unidades de SOD por mg de proteína.

A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada segundo o método descrito por Matsuno e Uritani (1972). Em cubetas de plástico, foram adicionados 750 μL de tampão fosfato-citrato pH 5,0. Em seguida, adicionou-se 50 μL da amostra e, depois, 50 μL de guaiacol, agitando tudo ao final com a ajuda de um vórtex. Foi preparada uma solução, protegida da luz, contendo 4500 μL de água e 500 μL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Acrescentou-se 50 μL dessa solução em cada cubeta, agitou-se de novo com a ajuda de um vórtex e as cubetas foram colocadas em banho maria a 30°C. Após 15 minutos, as cubetas foram retiradas do banho maria e imediatamente colocadas em gelo. Adicionou-se, em cada cubeta, 50 μL de solução de metabissulfito de sódio (2 g de metabissulfito de sódio diluídos em 100 mL de água destilada), agitando-se com um vórtex. Após 10 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 450 nm. Para cada amostra representativa de uma parcela, foram preparadas três cubetas. O preparo do branco foi feito o seguindo o mesmo procedimento, com a diferença de que foram adicionados 800 μL de tampão fosfato-citrato pH 5,0 e não houve adição de amostra. A diferença entre absorbância do branco e a da amostra acusa a presença do tetraguaicol, isto é, o guaiacol oxidado, que apresenta cor alaranjada. A atividade da GPX foi dada em nmol de tetraguaicol, por minuto, por mg de proteína.

3.1.4 Índice de área foliar e massa de matéria seca

O índice de área foliar e a massa de matéria seca foram avaliados aos 20 dias após a primeira e aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos. Foram coletadas, sistematicamente, duas plantas representativas por parcela e então foi feita a separação de cada planta em folha, haste e flor (na primeira avaliação, após a primeira aplicação) e em folha, haste e vagem (na segunda avaliação, após a segunda aplicação). As folhas foram primeiramente

analisadas por meio de um integrador óptico de área foliar (Li-Cor, modelo LAI-2000) para determinação da área foliar de cada planta. Em seguida, cada parte anteriormente separada da planta foi individualmente identificada em saco de papel e levada à estufa de secagem com ventilação forçada de ar a 60°C até peso constante para determinação da fitomassa seca. As pesagens foram realizadas em balança digital com precisão de 0,01 g. O índice de área foliar consiste na relação entre o valor dado pelo integrador (cm^2) e a área ocupada por uma planta (cm^2), dada pela densidade da população de plantas. Os valores representativos do índice de área foliar e massa de matéria seca de uma parcela foram obtidos pelas médias das duas plantas coletadas.

3.1.5 Número de vagens na maturidade

Quando as plantas atingiram a maturação plena (estádio fenológico R_6), selecionou-se, sistematicamente, duas plantas representativas por parcela e então foi feita a contagem do número de vagens por planta. A média das duas plantas foi dada como o número de vagens por planta representativo da parcela.

3.1.6 Produtividade

Para a avaliação da produtividade foram colhidas manualmente, as plantas localizadas na área útil de cada parcela. As plantas foram trilhadas em uma trilhadora estacionária de grãos e depois esses foram peneirados para eliminação de impurezas e, em seguida, pesados em balança digital com precisão de 0,01 g. Para o cálculo da produtividade, primeiro, corrigiu-se a produção obtida na parcela útil para a produção estimada em 1 ha. Segundo, corrigiu-se a umidade dos grãos para 13%. Para isso, foi medida a umidade dos grãos de cada parcela, segundo as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Foram tomadas duas amostras de grãos (sementes puras) de cada parcela e colocadas em recipientes de metal identificados. Esses foram levados à estufa de secagem com ventilação forçada de ar a 105°C, por 24 horas. A massa de sementes em cada recipiente foi medida antes e após a secagem, permitindo o cálculo da umidade das sementes, segundo a eq. (4), em que: U = umidade das sementes (%), M_u = massa de matéria úmida (g), M_s = massa de matéria seca (g) e T = massa (tara) do recipiente (g). A média das duas repetições foi considerada como a umidade de cada parcela. Sabendo-se a umidade, foi possível calcular a produtividade estimada em $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, corrigindo-se a massa de grãos pesada em cada parcela para 13% de umidade, que é o teor de água recomendado para armazenamento.

$$U = \frac{\text{Mu} - \text{Ms}}{\text{Mu} - \text{T}} \quad (4)$$

3.1.7 Massa de 1000 grãos

Para avaliar a massa de 1000 grãos, em cada parcela colhida, foram tomadas oito amostras de 100 grãos para determinação da massa. Quando o coeficiente de variação dessas oito amostras foi menor ou igual a 4%, considerou-se como o peso de 1000 sementes a média obtida, multiplicada por 10. Caso contrário, repetiu-se a contagem de outras oito repetições de 100 sementes e calculou-se o desvio padrão das 16 repetições. Foram desprezadas as repetições com divergência da média superior ao dobro do desvio padrão e, nesse caso, considerou-se como o peso de 1000 sementes a média obtida, multiplicada por 10 (BRASIL, 2009). As pesagens foram realizadas em balança digital com precisão de 0,01 g.

3.1.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade pelo software SAS® (SAS INSTITUTE, 2010).

3.2 Experimento II: câmara de crescimento

3.2.1 Instalação e condução

O experimento foi instalado entre os meses de dezembro de 2013 a janeiro de 2014, na câmara de crescimento da Estação Experimental Agrícola da BASF S.A., no município de Santo Antônio de Posse, SP (22° 53' de latitude Sul, 47° 04' de longitude Oeste e 696 m de altitude). Na câmara de crescimento, foi possível isolar qualquer inóculo de doença. A câmara foi ajustada para manter um fotoperíodo diário de 14 horas, à temperatura constante de 25°C, 75% de umidade relativa e irrigação de 4 mm diários, sendo assim, um ambiente ideal para o crescimento da soja.

As plantas foram conduzidas em vasos plásticos, com 20 cm de diâmetro de boca, 15 cm de diâmetro de fundo e 35 cm de altura, totalizando um volume de 8,47 L. Os vasos foram preenchidos com solo e foram igualmente adubados para atingirem boa fertilidade. Foram colocadas três sementes da variedade cultivada Apollo RR em cada vaso e, 10 dias após a emergência, foi feito um desbaste, deixando apenas a plântula mais vigorosa. Cada vaso contendo

uma planta representou uma parcela. A catação de plantas daninhas foi realizada de acordo com o aparecimento das mesmas.

3.2.2 Delineamento experimental e descrição dos tratamentos

Os tratamentos foram os mesmos utilizados no experimento em campo, com a diferença de que, devido à limitação de espaço na câmara que impossibilitou a condução das plantas até a fase reprodutiva, foi feita apenas uma aplicação dos tratamentos no estágio V₇. O delineamento experimental também foi em blocos ao acaso, porém, foram feitas apenas quatro repetições, ao invés de cinco.

3.2.3 Trocas gasosas e temperatura foliar

A avaliação foi realizada um dia após a aplicação dos tratamentos, entre 9 e 11 da manhã, por meio de um Analisador de Gás Infravermelho (IRGA), modelo Li-Cor 6400 XT. Foram lidas as medidas de fotossíntese líquida, respiração, condutância estomática, transpiração e temperatura foliar.

Durante as medições, foi selecionado o folíolo principal do trifólio mais novo e completamente expandido, que foi colocado dentro da câmara selada do equipamento, não suprida por ar externo. Para as medidas de fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e temperatura foliar, a câmara foi configurada para emitir $800 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa. Para as medidas de respiração, a densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes do equipamento foi desligada ($0 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade pelo software SAS® (SAS INSTITUTE, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

4.1.1 Atividade de enzimas antioxidantes

A aplicação dos fungicidas no estágio fenológico R₁ não promoveu diferenças na atividade da CAT nos diferentes tratamentos a 1 DAA. Já aos 4 DAA, a aplicação da Piraclostrobina na dose recomendada (75 g.ha⁻¹) reduziu a atividade da CAT em relação ao tratamento controle. As diferenças estatísticas desapareceram Aos 7 DAA (Figura 3). Uma possível explicação para esses resultados é de que o tempo de resposta da CAT à ação dos fungicidas é longo e, por isso, o intervalo de sete dias após a aplicação dos tratamentos provavelmente foi pouco para que as diferenças entre os tratamentos fossem evidenciadas. Em um experimento realizado por Zhang et al. (2010), em que foi avaliado o efeito fisiológico de fungicidas aplicados no milho em florescimento, as diferenças quanto à atividade da CAT entre os tratamentos foram mais acentuadas quando o milho atingiu o estágio de grãos duros. Comparando o tratamento com a estrobilurina Azoxistrobina e o tratamento com o triazol Tebuconazol, os autores também observaram uma inicial queda nos níveis de atividade da CAT no tratamento estrobilurina (como ocorreu para a Piraclostrobina na dose recomendada), mas, posteriormente, uma tendência de superioridade da estrobilurina, cujos altos níveis de atividade da enzima foram mantidos por mais tempo que no tratamento com triazol.

Figura 3 - Valores médios da atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol}[\text{H}_2\text{O}_2] \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol ($30 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) [Cpr(30)], Piraclostrobina ($100 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) [Pira(100)], Fluxapiroxade ($50 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) [Flux(50)], Piraclostrobina ($100 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) + Fluxapiroxade ($50 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina ($75 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 30,4%; 39,1% e 24,3%

Os resultados da atividade da CAT após aplicação dos fungicidas no estágio fenológico R_{5.1} estão apresentados na Figura 4. A 1 DA2A, o fungicida Piraclostrobina na dose de $100 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ apresentou maior atividade da CAT que a Testemunha e a Piraclostrobina na dose recomendada. Aos 4 e 7 DA2A, as diferenças estatísticas desapareceram, porém as plantas tratadas com Piraclostrobina na dose recomendada apresentaram tendência de maior atividade enzimática aos 7 DA2A. Esses resultados parecem seguir o mesmo comportamento daquele avaliado após a primeira aplicação. Porém, em R_{5.1}, a resposta da atividade da CAT ao tratamento com estrobilurina na dose recomendada foi mais rápida, podendo-se observar o crescimento exponencial da atividade enzimática durante os três dias de avaliação.

Figura 4 - Valores médios da atividade da catalase (CAT, $\mu\text{mol}[\text{H}_2\text{O}_2].\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapiroxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 24,2%; 28,8% e 28,4%

A aplicação dos fungicidas no estágio fenológico R_1 não promoveu diferenças na atividade da SOD nos diferentes tratamentos a 1 DAA. Já aos 4 DAA, a aplicação de todos os fungicidas reduziu a atividade da enzima em relação à Testemunha. Aos 7 DAA, o tratamento com Piraclostrobina na dose de 75 g.ha^{-1} apresentou maior atividade da SOD que os tratamentos com Fluxapiroxade, Piraclostrobina na dose de 100 g.ha^{-1} e Fluxapiroxade + Piraclostrobina (Figura 5). Esses resultados demonstram o comportamento da enzima em resposta à aplicação da Piraclostrobina na dose recomendada: a atividade enzimática é prejudicada num primeiro momento, apresentando-se menor que a da Testemunha, mas depois se recupera rapidamente, tendendo a ultrapassar os níveis no tratamento Controle, o que não acontece nos outros tratamentos fungicidas.

Figura 5 - Valores médios da atividade da superóxido dismutase (SOD, unidade SOD.mg⁻¹ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiróxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiróxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 19,9%; 21,6% e 12,0%

A aplicação dos fungicidas no estágio fenológico R_{5.1} não promoveu diferenças na atividade da SOD nos diferentes tratamentos em nenhuma das avaliações. No entanto, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresentou uma tendência de maior atividade enzimática aos 7 DA2A (Figura 6), o que deve estar associado aos altos níveis de CAT aos 7 DA2A, já que o substrato da CAT, o peróxido de hidrogênio, é o produto da reação catalisada pela SOD. A tendência de superioridade do tratamento Piraclostrobina na dose recomendada em relação ao tratamento com Ciproconazol corrobora com os resultados apresentados por Wu e Von Tiedemann (2001), que verificaram maiores atividades de SOD em plantas de trigo aplicadas com a estrobilurina Azoxistrobina em relação a daquelas aplicadas com o triazol Tebuconazol em estádios avançados do desenvolvimento da planta. Por outro lado, os tratamentos envolvendo a nova carboxamida Fluxapiróxade não apresentam tendência de superioridade da atividade da SOD.

Figura 6 - Valores médios da atividade da superóxido dismutase (SOD, unidade SOD.mg⁻¹ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 23,7%; 27,9% e 22,3%

A atividade da enzima GPX não se diferenciou estatisticamente entre os tratamentos em 1 e 4 DAA. Em contrapartida, aos 7 DAA, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresentou níveis de atividade da enzima significativamente acima de todos os outros tratamentos (Figura 7). Considerando o tratamento Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) aos 7 DAA, a atividade da GPX foi praticamente invertida à CAT, indicando que neste dia a GPX foi a principal catalisadora na decomposição do H₂O₂ liberado pela SOD, já que a GPX e a CAT atuam paralelamente entre si e complementarmente com a SOD. Segundo Mittler (2002), a maior diferença entre a CAT e a ascorbato peroxidase, uma outra peroxidase cujo radical oxidado é o ascorbato, está na afinidade de cada uma pelo H₂O₂. A afinidade da CAT está na faixa de mM de H₂O₂ enquanto que a da peroxidase está na faixa de μM. Essa diferença sugere que a GPX seja responsável pela fina modulação das espécies de oxigênio reativas para sinalização do sistema e a CAT seja responsável pela remoção do excesso desses radicais livres durante o estresse.

A Figura 8 apresenta a atividade da GPX após a segunda aplicação dos tratamentos. A 1 DA2A, a Testemunha apresentou valores de atividade enzimática estatisticamente maiores que o tratamento com Piraclostrobina + Fluxapiraxade. Aos 4 DA2A, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada foi superior aos tratamentos com Ciproconazol e Piraclostrobina na dose de 100 g.ha⁻¹. As diferenças estatísticas desapareceram aos 7 DA2A. Mais uma vez, as atividades da

GPX e CAT aos 7DA2A para o tratamento com Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) foram invertidas: dessa vez, a tendência de baixa atividade da GPX foi compensada pela tendência de alta da CAT.

Figura 7 - Valores médios da atividade da guaiacol peroxidase (GPX, $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapíroxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 23,1%; 33,6% e 22,3%

Figura 8 - Valores médios da atividade da guaiacol peroxidase (GPX, $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ [proteína]) presente na folha de soja no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapíroxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 42,3%; 27,4% e 53,5%

Como uma forma de analisar a atividade das enzimas antioxidantes em conjunto, foi proposto o índice de atividade enzimática (IAE, %), calculado de acordo com a eq. (5), para cada dia avaliado:

$$IAE = \sqrt{SOD \cdot \left(\frac{CAT + GPX}{2} \right)} \quad (5)$$

em que SOD é o valor da atividade de SOD de uma amostra dividido pelo valor médio das amostras referentes ao tratamento Controle, expresso em porcentagem; CAT é o valor da atividade de CAT de uma amostra dividido pelo valor médio das amostras referentes ao tratamento Controle, expresso em porcentagem e GPX é o valor da atividade de GPX de uma amostra dividido pelo valor médio das amostras referentes ao tratamento Controle, expresso em porcentagem.

A forma de cálculo do IAE foi baseada no mecanismo de ação de cada uma das três enzimas avaliadas. A SOD atua na eliminação do oxigênio reativo, transformando-o em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Por outro lado, tanto a CAT como a GPX atuam na eliminação do peróxido de hidrogênio, promovendo a sua redução à água, na presença de um agente redutor. Sendo assim, a CAT e a GPX atuam de forma paralela entre si e de forma complementar em relação à SOD, já que o produto final da SOD é o substrato da reação catalisada pela CAT e pela GPX. Por isso, para o cálculo do IAE, foi feita a média aritmética entre as enzimas que atuam em paralelo (CAT e GPX) e a média geométrica entre as enzimas que atuam em série (SOD e CAT/GPX). Os valores da atividade de cada enzima foram transformados em porcentagem, relativa ao tratamento Controle de cada data avaliada, a fim de facilitar a comparação dos tratamentos em relação ao Controle, ou seja, mensurar quantos pontos percentuais a mais (valores acima de 100%) ou a menos (valores abaixo de 100%) o tratamento analisado ganhou ou perdeu em relação à Testemunha sem aplicação. As Figuras 9 e 10 mostram o IAE calculado após a primeira e após a segunda aplicação, respectivamente.

Figura 9 - Valores médios do índice de atividade enzimática (IAE, %) dos tratamentos: Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)] em relação ao tratamento Controle (Cont). As medições foram feitas no primeiro, quarto e sétimo dia após a primeira aplicação dos tratamentos (DAA). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DAA, 4 DAA e 7 DAA foram de, respectivamente, 19,9%; 27,9% e 4,6%

A análise comparativa dos tratamentos fungicida em relação ao Controle sem aplicação nos permite observar que há uma tendência de redução na atividade das enzimas antioxidantes logo após a aplicação de todos os fungicidas, a 1 DAA, porém, essa redução só foi estatisticamente significativa no tratamento com Ciproconazol. Aos 4 DAA, a ação das enzimas se iguala em todos os tratamentos. Por fim, aos 7 DAA, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresenta atividade enzimática estatisticamente superior aos tratamentos Piraclostrobina na dose de 100 g.ha⁻¹ e Fluxapiroxade, além de apresentar uma tendência de maior atividade enzimática em relação a todos os tratamentos (Figura 9).

Esses resultados corroboram com os de Rodrigues (2009), cujas plantas de soja tratadas com a mistura Piraclostrobina (estrobilurina) + Epoxiconazol (triazol) apresentaram maiores atividades de enzimas antioxidantes do que aquelas tratadas apenas com um triazol, o Tebuconazol. Por outro lado, a baixa atividade enzimática encontrada no tratamento com Fluxapiroxade vai de encontro aos resultados apresentados por Lacerda (2014), em que o

tratamento de sementes com Fluxapiroxade promoveu maior atividade da CAT e maior teor de peróxido de hidrogênio (indicador da atividade da SOD) em plântulas de soja.

A Figura 9 também sugere, devido à baixa atividade enzimática do tratamento com Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹), que a elevada dose da Piraclostrobina tem efeito contrário ao produzido pelo mesmo ingrediente ativo na dose recomendada, sendo prejudicial à planta.

Figura 10 - Valores médios do índice de atividade enzimática (IAE, %) dos tratamentos: Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100)+Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)] em relação ao tratamento Controle (Cont). As medições foram feitas no primeiro, quarto e sétimo dia após a segunda aplicação dos tratamentos (DA2A). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os coeficientes de variação em 1 DA2A, 4 DA2A e 7 DA2A foram de, respectivamente, 20,2%; 24,7% e 20,2%

Nas avaliações realizadas após a segunda aplicação (Figura 10), as diferenças estatísticas só apareceram aos 7 DA2A, quando, mais uma vez, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada se sobressaiu, apresentando uma atividade enzimática de 118% em relação ao tratamento controle. Estatisticamente, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada foi superior ao tratamento com Piraclostrobina + Fluxapiroxade. Na figura também fica claro o comportamento das enzimas antioxidantes no tratamento com a Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹). Diferente de todos os outros tratamentos, a atividade das enzimas aumenta a uma taxa elevada, tanto no intervalo entre 1 DA2A e 4 DA2A quanto entre 4 DA2A e 7 DA2A.

4.1.4 Índice de área foliar

Todos os tratamentos apresentaram desempenho semelhante em termos de índice de área foliar aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (Figura 11).

Figura 11 - Valores médios do índice de área foliar (IAF, m².m⁻²) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 43,0%

Figura 12 - Valores médios do índice de área foliar (IAF, m².m⁻²) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 20,1%

Todos os tratamentos apresentaram desempenho semelhante em termos de índice de área foliar aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (Figura 12).

4.1.5 Massa de matéria seca

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca de folha aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (Figura 13).

Figura 13 - Valores médios da massa de matéria seca de folha (MSF, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 37,3%

Figura 14 - Valores médios da massa de matéria seca de haste (MSH, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 41,3%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca de haste aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (Figura 14).

O tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresentou maior massa de matéria seca de flores que o tratamento Controle aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (Figura 15). Além disso, o tratamento com a estrobilurina apresentou uma tendência de ter maior massa de matéria seca de flores do que todos os outros tratamentos, o que indica um maior ou mais antecipado deslocamento de fotoassimilados para o sistema reprodutivo da planta, sugerindo que essas plantas estariam priorizando sua produção.

Figura 15 - Valores médios da massa de matéria seca de flor (MSFL, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapíroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 23,5%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca total aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (Figura 16).

Figura 16 - Valores médios da massa de matéria seca total (MST, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapirroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapirroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 35,2%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca de folha aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (Figura 17).

Figura 17 - Valores médios da massa de matéria seca de folha (MSF, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapirroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapirroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 21,4%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca de haste aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (Figura 18).

Figura 18 - Valores médios da massa de matéria seca de haste (MSH, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 22,5%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca de vagens aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (Figura 19).

Figura 19 - Valores médios da massa de matéria seca de vagens (MSV, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 25,7%

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca total aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (Figura 20).

Figura 20 - Valores médios da massa de matéria seca total (MST, g.planta⁻¹) de soja aos 20 dias após a segunda aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 20,6%

4.1.6 Número de vagens

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ao número de vagens em R₆ (Figura 21). Esse resultado não reflete a superioridade do tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada que foi apresentado para a massa de matéria seca de flor. Porém, pode ser que as vagens desse tratamento continham maior número de grãos por vagem, o que explicaria a maior realocação de nutrientes para as flores, constatada aos 20 dias após a primeira aplicação.

Figura 21 - Valores médios do número de vagens (NV, vagens.planta⁻¹) quando as plantas de soja se encontravam na maturidade plena, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 21,6%

Em experimento semelhante, Moura (2013) observou que as plantas de soja tratadas com Azoxistrobina + Ciproconazol apresentaram até uma redução no número de vagens, inclusive com relação ao tratamento Testemunha, porém essa desvantagem foi compensada pela maior massa das vagens colhidas.

4.1.7 Produtividade

O tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresentou estatisticamente maior produtividade do que o tratamento com Piraclostrobina na dose de 100 g.ha^{-1} e do que o tratamento com Fluxapirroxade. O tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada também mostrou uma tendência de superioridade em relação a todos os outros tratamentos, com uma média de produtividade de 115% (13 sacas a mais por hectare) àquela do tratamento Controle e 112% (10,6 sacas a mais por hectare) que o tratamento com Ciproconazol (Figura 22). Esses resultados concordam com aqueles obtidos para a atividade das enzimas antioxidantes, sugerindo que o Fluxapirroxade não possui efeito fisiológico e que a elevada dose da Piraclostrobina, embora não promova qualquer sintoma de fitotoxicidade, não exerce o efeito benéfico que é observado na dose recomendada, já citado por outros autores (FAGAN, 2007; RODRIGUES, 2009; FAGAN et al., 2010; ANSELMO et al., 2010; MACEDO, 2012; MARTINS, 2011).

Figura 22 - Valores médios de produtividade (P, kg.ha^{-1}) de grãos de soja, a 13% de umidade, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapirroxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapirroxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 13,3%

4.1.8 Massa de 1000 grãos

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à massa de 1000 grãos (Figura 23). Observando o tratamento com Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}), que obteve maior produtividade, pode-se verificar que o mesmo apresentou uma tendência de menor massa de 1000 grãos que a maioria dos tratamentos. Tendo em vista que ele também não se destacou em termos de número de vagens por planta, os altos valores de produtividade só podem ser justificados pelo maior número de grãos por vagem, como já foi comentado anteriormente. Em experimento similar realizado com feijoeiro, Kozłowski et al. (2009) também detectaram maiores produtividades do tratamento com Piraclostrobina mas não encontraram diferenças entre os tratamentos quanto à massa de 1000 grãos. Por outro lado, em um experimento com plantas de soja tratadas com a mistura da estrobilurina Azoxistrobina e o triazol Ciproconazol, ocorreram incrementos na massa de 100 grãos, em relação ao tratamento Controle (MOURA, 2013).

Figura 23 - Valores médios da massa de 1000 grãos de soja (M1000, g), a 13% de umidade, segundo os tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapiraxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 3,5%

4.2 Experimento II

4.2.1 Fotossíntese líquida

Os tratamentos Piraclostrobina na dose recomendada, Fluxapiraxade e Ciproconazol apresentaram maiores valores de fotossíntese líquida que o tratamento Controle (Figura 24).

O efeito fisiológico das estrobilurinas na fotossíntese líquida da planta já foi relatado por outros autores. Em plantas de melão rendilhado sob cultivo protegido, aplicadas com

Piraclostrobina na dose recomendada, verificou-se maior eficiência de carboxilação (razão entre a fotossíntese líquida e a concentração interna de CO₂ nas folhas) do que as plantas não tratadas (MACEDO, 2012). Em plantas de soja, cultivadas em campo e aplicadas com Piraclostrobina tanto em R₁ quanto em R_{5,1}, foram observados incrementos significativos na taxa fotossintética. Esse efeito foi constatado poucas horas após a aplicação e foi mantido durante os 17 dias seguintes, em que o tratamento com Piraclostrobina teve melhor desempenho que o tratamento com Tebuconazol (Testemunha relativa) e este se sobressaiu ao tratamento sem aplicação (Testemunha absoluta) (FAGAN et al., 2010).

Figura 24 - Fotossíntese líquida (FL, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiraxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 15,23%

4.2.2 Respiração

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à respiração das plantas, um dia após a aplicação dos fungicidas (Figura 25). No entanto, o tratamento com Piraclostrobina na dose recomendada apresentou o maior valor de respiração, 79% maior que a respiração mensurada no tratamento Controle. Esses dados contradizem os obtidos por Martins (2011), que constatou menores valores de respiração em plantas de soja que receberam aplicação da Piraclostrobina em comparação com as tratadas com um fungicida triazol, tanto nas folhas do estrato inferior quanto superior das plantas. De acordo com Köhle et al. (2003), o efeito fisiológico da Piraclostrobina está menos relacionado a uma diminuição no ponto compensatório

do CO_2 e mais associado ao modo de ação delas na respiração mitocondrial dos fungos. Assim, o fungicida estaria exercendo também uma inibição passageira da respiração vegetal e, consequentemente, contribuindo para o incremento da fotossíntese líquida. Por outro lado, Venancio et al. (1999) afirmam que o ingrediente ativo das estrobilurinas atua em doses que não atingem células vegetais ou animais. Dessa forma, os resultados aqui apresentados sugerem que o efeito fisiológico da Piraclostrobina só pode ser justificado por um aumento na fotossíntese bruta (FB), visto que foram observados aumentos tanto para a fotossíntese líquida (FL) quanto para a respiração (R) [eq. (6)].

$$FL = FB - R \quad (6)$$

Figura 25 - Respiração (R, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha^{-1}) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha^{-1}) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) + Fluxapiroxade (50 g.ha^{-1}) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 53,4%

4.2.3 Condutância estomática

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à condutância estomática, um dia após a aplicação dos fungicidas. Porém, todos os tratamentos fungicidas, em ordem decrescente de valores absolutos - Fluxapiroxade, Piraclostrobina na dose recomendada, Piraclostrobina + Fluxapiroxade, Piraclostrobina, na dose de 100 g.ha^{-1} , e Ciproconazol - tenderam a apresentar maior condutância estomática que o tratamento Controle. Os dados de condutância estomática refletem os obtidos pela taxa fotossintética e respiração, visto que o

movimento de abertura e fechamento dos estômatos está relacionado às trocas gasosas realizadas pela planta (Figura 26).

Figura 26 - Condutância estomática (CE, mmol[H₂O].m⁻².s⁻¹), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cipr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 25%

4.2.4 Transpiração

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à transpiração, um dia após a aplicação dos fungicidas. Porém, todos os tratamentos fungicidas, em ordem decrescente de valores absolutos - Fluxapiroxade, Piraclostrobina + Fluxapiroxade, Piraclostrobina na dose recomendada, Piraclostrobina na dose de 100 g.ha⁻¹ e Ciproconazol - tenderam a apresentar maior transpiração que o tratamento Controle. A transpiração das plantas tratadas com Piraclostrobina na dose recomendada, por exemplo, é de 1,75 vezes maior que as plantas Testemunha, corroborando com os dados de Martins (2011), que encontrou valores de transpiração maiores tanto nas folhas do estrato inferior quanto superior de plantas de soja aplicadas com a Piraclostrobina (Figura 27).

Figura 27 - Transpiração (TR, mmol.m⁻².s⁻¹), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 37,4%

4.2.5 Temperatura foliar

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à temperatura foliar, um dia após a aplicação dos fungicidas (Figura 28).

Figura 28 - Temperatura foliar (TF, °C), um dia após a aplicação dos tratamentos (T): Controle (Cont), Ciproconazol (30 g.ha⁻¹) [Cidr(30)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) [Pira(100)], Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Flux(50)], Piraclostrobina (100 g.ha⁻¹) + Fluxapiroxade (50 g.ha⁻¹) [Pira(100) + Flux(50)] e Piraclostrobina (75 g.ha⁻¹) [Pira(75)]. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação foi de 4,2%

4.3 Considerações finais

Com base nos resultados apresentados, pôde-se observar que o fungicida Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) (dose recomendada para a cultura da soja), além de exercer o controle de doenças, teve influência na fisiologia da planta de soja. As plantas tratadas com Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes, massa de matéria seca de flores, taxa fotossintética líquida e produtividade. Por outro lado, a aplicação da Piraclostrobina acima da sua dose recomendada promoveu efeitos negativos na fisiologia da planta, reduzindo a atividade das enzimas antioxidantes e a produtividade, porém não foi observado qualquer sintoma de fitotoxicidade.

Quanto ao novo fungicida Fluxapíroxade, observou-se que a sua aplicação nas plantas de soja elevou a taxa fotossintética, porém reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e também a produtividade, em relação à Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}). A mistura do Fluxapíroxade com a Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) também reduziu a atividade das enzimas antioxidantes, o que refletiu em uma tendência de prejuízo à produtividade. Portanto, o Fluxapíroxade, tanto isolado quanto em mistura com a Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}), parece não exercer efeito fisiológico que beneficie a produção ou qualidade da produção de soja. Porém, mais pesquisas acerca desse ingrediente ativo são necessárias, principalmente, para entender porque o efeito causado na taxa fotossintética não foi refletido na produtividade. Talvez, tanto as avaliações de trocas gasosas quanto as de atividade enzimática poderiam ser analisadas por um tempo mais longo após as aplicações.

5 CONCLUSÕES

O fungicida Fluxapirroxade (50 g.ha^{-1}) isolado e em mistura com a Piraclostrobina (100 g.ha^{-1}) não alterou o índice de área foliar, a massa de matéria seca, a respiração, a transpiração, a condutância estomática, a temperatura foliar, o número de vagens e a massa de 1000 grãos em plantas de soja na ausência de doenças. Porém, a aplicação do Fluxapirroxade isolado reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e também a produtividade, embora tenha elevado a taxa fotossintética líquida. Em mistura com a Piraclostrobina, houve uma redução da atividade das enzimas antioxidantes, o que refletiu em uma tendência de prejuízo à produtividade. Por outro lado, o fungicida Piraclostrobina (75 g.ha^{-1}) apresentou maiores massa de matéria seca de flor, atividade das enzimas antioxidantes, taxa fotossintética líquida e produtividade, o que sugere uma atuação benéfica desse fungicida no metabolismo fotossintético e antioxidante da planta. Na dose de 100 g.ha^{-1} , entretanto, a Piraclostrobina reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e a produtividade, parecendo exercer efeito contrário àquele observado para a dose de 75 g.ha^{-1} , embora não tenha apresentado qualquer sintoma de fitotoxicidade.

REFERÊNCIAS

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 3 abril 2014.

AMARO, A.C.E. **Efeitos fisiológicos de fungicidas no desenvolvimento de plantas de pepino japonês enxertadas e não enxertadas, cultivadas em ambiente protegido**. 2011. 86p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2011.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.

ANSELMO, J.L.; LEONEL, T.Z.; HOLANDA, H.V.; SANTOS, F.R.; KANEKO, F.H.; FRANCISCO, P.M.S. Efeito de fungicida na produtividade em cultivares de sorgo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais...Goiânia**: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p. 1775-1781.

AZEVEDO, L.A.S.; LEITE, O.M.C. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. 48p.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Dublin, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BONATO, E.R.; BERTANGNOLLI, P.F.; LANGE, C.E.; RUBIN, S.A.L. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2391-2398, Dez. 2000.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

CASTILLO, R.; VENCOVSKY, V. A soja nos cerrados brasileiros: novas regiões, novo sistema de movimentos. **Revista Reforma Universitária**, Campinas, n. 53, Abr. 2004. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/200404/reportagens/16.shtml>> Acesso em: 22 abril 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos. Brasília, v. 1, n. 6, 83 p. Mar. 2014.

COUTINHO C.F.B.; GALLI, A.; MAZO, L.H.; MACHADO, S.A.S. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 16, p. 63-70, Jan./ Dez. 2006.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 43-65, 1986.

DIAZ-ESPEJO, A.; CUEVASA, M.V.; RIBAS-CARBOB, M.; FLEXASB, J.; MARTORELLB, S.; FERNÁNDEZ, J.E. The effect of strobilurins on leaf gas exchange, water use efficiency and ABA content in grapevine under field conditions. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 169, n. 4, p. 379-386, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja: Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa soja, 2004. 15p. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca>>. Acesso em: 7 abril 2014.

FAGAN, E.B. **A cultura da soja: modelo de crescimento e aplicação da estrobilurina piraclostrobina**. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

FORCELINI, C.A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. Triazoles. **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 335-355, 1994.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 59, p. 309-314, Jan. 1977.

GIULIANI, M.M.; NARDELLA, E.; GATTA, G.; DE CARO, A.; QUITADAMO, M. Processing tomato cultivated under water deficit conditions: the effect of azoxystrobin. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASES, 3., 2010. v. 914; Ischia. **Acta Horticulturae**, Leuven: International Society for Horticultural Science, 2011. p. 287-294.

GROSSMANN, K.; KWIATKOWSKI, J.; GASPAR, G. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin Kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, p. 805-808, 1999.

HAY, R.K.M.; WALKER, A.J. **An introduction to the physiology of crop yield**. England: Longman Group, 1989. 292p.

JADOSKI, C.J. **Efeitos fisiológicos da piraclostrobina em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) condicionado sob diferentes tensões de água no solo**. 2012. 80p. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Sydney, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. Buenos Aires: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 479p.

KÖHLE, H.; GOLD, R.E.; AMMERMAN, E.; SAUTER, H.; ROEHL, F. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 22, p. 65S, 1994.

KÖHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F500 on plants. Bonn: Agroconcept, 2003. 16p.

KOZLOWSKI, L.A.; SIMÕES, D.F.M; SOUZA, C.D.; TRENTO, M. Efeito fisiológico de estrobilurina F500® no crescimento e rendimento do feijoeiro. **Revista Acadêmica Ciências Agrária e Ambientais**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 41-54, Jan./Mar. 2009.

KRAUSS, E.; WILSON, D.; ROBSON, M.J. Respiration: correlation with growth rate and its quantitative significance for net assimilation rate and biomass production. In: LAMBERS et al. (Ed.) **Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants**. Hague: Netherlands, 1989. p. 187-198.

LACERDA, M.P. **Caracterização fisiológica de plântulas de soja submetidas a diferentes tratamentos químicos**. 2014. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S.; SILVA, S.H.M. Respostas fisiológicas em mudas de bananeira tratadas com estrobilurinas. **Semina - Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.1, p.77-86, 2012.

MACEDO, A.C. **Efeitos fisiológicos de fungicidas no desenvolvimento de plantas de melão rendilhado, cultivadas em ambiente protegido**. 2012. 66p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

MARTINS, K.V. **Caracterização fisiológica e influência das folhas senescentes do estrato inferior na produtividade da cultura de soja**. 2011. 77p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 13-18, Jan-Fev. 2009.

MIKA, A.; LUTHJE, S. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 132, n. 3, p. 1489-1498, 2003.

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

MOURA, P.C.S. **Efeitos fisiológicos da aplicação de triazol e estrobilurina em soja.** 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PIRES, J.L.F.; COSTA, J.A.; THOMAS, A.L.; MAEHLER, A.R. Efeito de populações e espaçamentos sobre o potencial de rendimento da soja durante a ontogenia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1541-1547, Ago. 2000.

ROBSON, M.J. The growth and development of simulated sward of perennial ryegrass. II – Carbon assimilation and respiration in a seedling sward. **Annals of Botany**, Oxford, v. 37, n. 151, p. 501-518, 1973.

RODRIGUES, M.A.T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC.** 2006. 249 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2006.

RODRIGUES, M.A.T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja.** 2009. 197p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; VILDOSO, C.I.A; ARAÚJO, W.L.; KLEINER, A.A.P. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 323-327, 2007.

ROLÃO, M.B. **Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio.** 2010. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SAS INSTITUTE. The SAS system, release 9.3. Cary, 2010.

SAUTER, H.; AMMERMAN, E.; BENOIT, R.; BRAND, S.; GOLD, R.E.; GRAMMENOS, W.; KOHLE, H.; LORENZ, G.; MUELLER, B.; ROEHL, F.; SCHIRMER, D.; SPEAKMAN, J.B.; WENDEROTH, B.; WINGERT, H. Mitochondrial respiration as a target for antifungals: lessons from research on strobilurins. In: antifungal agents. In; DIXON, G.K.; COPPING, L.G.; HOLLOMON, D.W. **Discovery and mode of action.** Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1995. p. 173-191.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, New York, v. 28, p. 1-41, 1990.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SILVA, M.A.; FERREIRA, W.P.M.; DE ANDRADE, V.M.S.; DA COSTA, J.M.N.; NEVES, L.O.; DE OLIVEIRA, E.C.; GONÇALVES, P.H.; MOSCON, E.S.; BEZERRA, A.R.G. Influência da área foliar na assimilação de CO₂ ao longo dos estádios fenológicos em um dossel

de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 17., 2011, Guarapari. **Anais...** Guarapari: SESC Centro de Turismo de Guarapari, 2011. 5p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820p.

TERAMOTO, A.; MACHADO, T.A.; NASCIMENTO, L.M.; MEYER, M.C.; CUNHA, M.G. Sensibilidade a fungicidas de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes do estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2012. 1 CD-ROM.

TIMBÓ, R.V. **Estudo bioquímico da soja em defesa induzida pela herbivoria do percevejo-marrom *Euchistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae)**. 2013. 81p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

TOMLIN, C.D.S. **The pesticide manual: a world compendium**. 12 ed. Surrey, United Kingdom: British Crop Protection Council, 2002. 1 CD-ROM.

VENANCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L. Novos fungicidas. I - produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 103-155, 1999.

VENTIMIGLIA, L.A.; COSTA, J.A.; THOMAS, A.L.; PIRES, J.L.F. Potencial de rendimento da soja em razão da disponibilidade de fósforo no solo e dos espaçamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 195-199, Fev. 1999.

VON JAGOW, G.; LINK, T.A. Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 126, p. 253-271, 1986.

VON PINHO, R.G.; BORGES, I.D.; PEREIRA, J.L.R.; REIS, M.C. Marcha de absorção de macronutrientes e acúmulo de matéria seca em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 2, p. 157-173, 2009.

WU, Y.X.; VON TIEDEMANN, A. Physiological effects of azoxystrobin and Epoxiconazol on senescence and the oxidative status of wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 71, p. 1-10, 2001.

YORINORI, J.T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem asiática da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; FERNANDEZ, P.F.T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Embrapa, 2002. p. 94.

ZHANG, Y.J.; ZHANG, X.; CHEN, C.J.; ZHOU, M.G.; WANG, H.C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazol, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Massachusetts, v. 98, n. 2, p. 151-157, Oct. 2010.