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

Efeitos fisiológicos e bioquímicos provocados pela aplicação dos fungicidas
benzovindiflupir+azoxistrobina e protioconazol+trifloxistrobina na cultura da soja

Aécio Mendes da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2019

Aécio Mendes da Silva
Engenheiro Agrônomo

Efeitos fisiológicos e bioquímicos provocados pela aplicação dos fungicidas
benzovindiflupir+azoxistrobina e prothioconazol+trifloxistrobina na cultura da
soja

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2019

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

Silva, Aécio Mendes da

Efeitos fisiológicos e bioquímicos provocados pela aplicação dos fungicidas benzovindiflupir+azoxistrobina e protioconazol+trifloxistrobina na cultura da soja / Aécio Mendes da Silva. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2019.

113 p.

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

1. Fungicida 2. Soja 3. Benzovindiflupir 4. Protioconazol 5. Efeitos fisiológicos I. Título

DEDICATÓRIA

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a perseverança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada, amada companheira, seu apoio foi o alicerce no qual pude me apoiar para seguir essa caminhada. Em especial dedico a pequena Helena, por ter preenchido nossas vidas com alegria e razão para sorrir sempre.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, por serem a minha base e exemplos de retidão, honestidade e perseverança, e de quem sempre recebi amor incondicional. Agradeço de maneira especial a minha amada companheira Bruna Cortes Queiroz pela compreensão e apoio nessa jornada.

À Esalq, que formou um alicerce que me permitiu galgar outras oportunidades e forneceu condições para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos do LEPSE Aldeir Ronaldo Silva, Diogo Capelin, Gabriel Silva Daneluzzi, Fábila Barbosa da Silva, Francynês Macedo e Natalia Salib pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

Ao meu orientador, professor Ricardo Ferraz de Oliveira, pela parceria, pelo apoio e por todos os ensinamentos, e em especial por ter me convidado para fazer parte da família do Laboratório de Estudo de Plantas Sob Estresse (LEPSE), a isso sou muito grato e não esquecerei nunca.

Aos funcionários do departamento Francisco Vitti, José Francisco Rodrigues e Karinna Trevisan, pela disponibilidade em ajudar.

Ao programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e aos professores que me deram a oportunidade de aprender.

Ao coordenador do programa Ricardo Kluge, pelo apoio e compreensão.

À Maria Solizete Granziol Silva, pela competência e amizade.

Aos amigos que de longe ou de perto contribuíram para a minha formação.

Aos demais aqui não citados, porém não menos importantes, que direta ou indiretamente me ajudaram e fizeram parte desta jornada.

EPÍGRAFE

*“E, se bem que seja obscuro
Tudo pela estrada fora,
E falso, ele vem seguro,
E, vencendo estrada e muro,
Chega onde em sono ela mora.
E, inda tonto do que houvera,
A cabeça, em maresia,
Ergue a mão, e encontra hera,
E vê que ele mesmo era A Princesa que dormia.”.*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA SOJA	21
2.2. FUNGICIDAS UTILIZADOS NA CULTURA DA SOJA	23
2.3. ALTERAÇÕES DE ORDEM FOTOSSINTÉTICA	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. CULTIVO DA SOJA	35
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.3. IMPOSIÇÃO DOS TRATAMENTOS	37
3.4. AVALIAÇÕES.....	38
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADOS	45
4.1. EXPERIMENTO I (TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA)	45
4.2. EXPERIMENTO II (BIOQUÍMICA)	61
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICES	87

RESUMO

Efeitos fisiológicos e bioquímicos provocados pela aplicação dos fungicidas benzovindiflupir+azoxistrobina e protioconazol+trifloxistrobina, na cultura da soja

Atualmente a soja é uma das principais culturas de interesse econômico cultivadas no Brasil, sendo que o país configura como o segundo maior produtor da oleaginosa, ficando atrás apenas da produção obtida pelos Estados Unidos da América. Para se proteger essa alta produtividade e manter o Brasil em um cenário econômico competitivo, os produtores brasileiros utilizam diversos defensivos agrícolas. Destes, os fungicidas são principalmente utilizados de maneira preventiva, ou seja, sem a presença do patógeno alvo, isso ocorre principalmente devido ao modo de ação dos princípios ativos disponíveis comercialmente na atualidade. Essa utilização preferencial de fungicidas de maneira preventiva, fez com que crescesse também o interesse pelo estudo dos efeitos, sejam eles positivos ou negativos, na fisiologia e bioquímica das plantas cultivadas. O presente experimento foi instalado em casa de vegetação no município de Holambra-SP, tendo por objetivo avaliar os efeitos fisiológicos e bioquímicos provocados pela aplicação dos fungicidas benzovindiflupir+azoxistrobina (STL+AZT) e protioconazol+trifloxistrobina (PTZ+TFS), na cultura da soja. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados contando com seis repetições cada. Os tratamentos com fungicidas utilizados foram: [T1] controle (testemunha); [T2] plantas que receberam aplicação de STL+AZT (30 + 60 g de ingrediente ativo por hectare), com adição do adjuvante Nimbus a 600 ml por hectare, conforme recomendação do fabricante; [T3] plantas que receberam aplicação de PTZ+TFS (70 + 60 g de ingrediente ativo por hectare), com adição do adjuvante Aureo a 400 ml por hectare, conforme recomendação do fabricante. Foram realizadas duas aplicações, sendo a primeira 42 dias após a emergência das plantas, quando estas se encontravam na fase de início de florescimento (R1) e a segunda com 15 dias de intervalo da primeira. Os tratamentos foram avaliados através de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e enzimas do sistema antioxidante. Não foram observadas alterações significativas na eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e eficiência quântica máxima (F_v'/F_m') do fotossistema II (PSII) para nenhum dos fungicidas testados. Entretanto observou-se que a utilização de PTZ+TFS reduziu de maneira significativa no rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e na proporção de centro de reações do PSII “abertos” (qP), sendo que reduções na condutância estomática (g_s), transpiração (E), taxa de assimilação de CO_2 (A) e na velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($V_{c_{máx}}$) também foram observadas quando se aplicou esse fungicida. Além das reduções observadas, constatou-se também que esse fungicida provoca uma elevação da temperatura foliar (T_f). Além dessas alterações fotoquímicas, foi também observado um aumento da atividade das enzimas dismutase da superóxido (SOD) e glutatona redutase (GR). Em contrapartida a utilização de STL+AZT aumentou Φ_{PSII} , ETR e qP, assim como elevação em g_s , E, $V_{c_{máx}}$ e consequentemente em A também foram observados.

Palavras-chave: Fungicida; Soja; Benzovindiflupir; Protioconazol; Efeitos fisiológicos

ABSTRACT

Physiological and biochemical effects of the fungicides benzovindiflupir + azoxystrobin and prothioconazole + trifloxystrobin on soybean

Currently soybean is one of the main crops of economic interest cultivated in Brazil, and the country is the second largest producer of this oilseed, behind only of the production obtained by the United States of America. In order to protect this high productivity and keep Brazil in a competitive economic scenario, brazilian growers use several agricultural pesticides. Among these pesticides, fungicides are mainly used in a preventative way, that is, without the presence of the target pathogen, this is mainly due to the mode of action of the currently commercially available active ingredients. This preferential use of preventative fungicides has also increased the interest in studying the effects, whether positive or negative, on the physiology and biochemistry of cultivated plants. The present experiment was carried out in a greenhouse in the municipality of Holambra-SP, Brazil, to evaluate the physiological and biochemical effects of the fungicides benzovindiflupir + azoxystrobin (STL+AZT) and prothioconazole + trifloxystrobin (PTZ +TFS) on soybeans. The experimental design was a randomized block design with six replicates each. The treatments with fungicides used were: [T1] control (control); [T2] plants receiving STL + AZT (30 + 60 g of active ingredient per hectare), with addition of the Nimbus adjuvant at 600 ml per hectare, according to the manufacturer's recommendation; [T3] plants receiving PTZ + TFS (70 + 60 g active in per hectare), with addition of the Aureo adjuvant at 400 ml per hectare, according to the manufacturer's recommendation. Two applications were performed, the first was 42 days after the emergence of the plants when they were in the begning of flowering (R1) and the second after 15 days of the first one. The treatments were evaluated through gas exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant system enzymes. No significant changes were observed in the potential quantum efficiency (F_v/F_m) and the maximum quantum efficiency (F_v'/F_m') of photosystem II (PSII) for none of the fungicides tested. However, it was observed that the use of PTZ+TFS significantly reduced the effective quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), the apparent electron transport rate (ETR), and reductions in stomatal conductance (g_s), transpiration (E), CO_2 assimilation rate (A) and the maximum rate of carboxylation of rubisco ($V_{c_{max}}$) were also observed when applying this fungicide. In addition to the observed reductions, it was also verified that this fungicide causes a rise in leaf temperature (T_l). In addition to these photochemical alterations, an increased activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) was also observed. In contrast, the use of STL + AZT increased Φ_{PSII} , ETR and qP , as well as elevation in g_s , E, $V_{c_{max}}$ and consequently in A were also observed.

Keywords: Fungicide; Soybean; Benzovindiflupir; Prothioconazole; Physiological effects

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cartograma de área plantada com soja no Brasil (gerado a partir da plataforma SIDRA-IBGE (https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618)).	21
Figura 2. Destinos da soja no Brasil (Aprosoja, 2014)	22
Figura 3. Modelo de ação das estrobilurinas sobre a fisiologia e metabolismos das plantas (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M;; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002).	27
Figura 4. Efeitos da aplicação de estrobilurina sobre etileno e enimas do sistema antioxidante (KANUNGO; JOSHI, 2014)	29
Figura 5. Temperatura média, máxima e mínima durante o período de avaliação do experimento.	35
Figura 6. Disposição dos vasos em blocos casualizados	36
Figura 7. Representação esquemática dos experimentos.	36
Figura 8. Pulverizador costal com pressurização por ar comprimido	38
Figura 9. Cloroflog Falker CFL1030	39
Figura 10. Analisador de gases por infravermelho (IRGA)	39
Figura 11. Conteúdo de clorofila a e b. (A) Índice Falker de clorofila para conteúdo de clorofila <i>a</i> nos diferentes dias após a imposição dos tratamentos. (B) Média do índice Falker de clorofila para clorofila <i>a</i> e tratamentos (STL+AZT e PTZ+TFS). (C) Índice Falker de clorofila para conteúdo de clorofila <i>b</i> nos diferentes dias após imposição dos tratamentos. (D) Média do índice Falker de clorofila para clorofila <i>b</i> e tratamentos (STL+AZT e PTZ+TFS). (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	45
Figura 12. Fluorescência da clorofila <i>a</i> para plantas adaptadas ao escuro e ao claro. Indicação das possíveis rotas de dissipação da energia absorvida. Adaptado de (KALAJI; GUO, 2008). ML (Luz de medida), SP (Pulso de luz saturante). AL (Luz Actínica), FR (Pulso de luz vermelho distante).	46
Figura 13. Parâmetros fotoquímicos da fluorescência da clorofila <i>a</i> . (A) Fluorescência inicial para plantas adaptadas ao escuro (F_o). (B) Fluorescência inicial para plantas adaptadas ao claro (F_o'). (C) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao escuro (F_m). (D) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro (F_m'). (E) Eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m). (F) Eficiência quântica do PSII (F_v'/F_m'). (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	48
Figura 14. Caminhos de dissipação da energia luminosa. (A) Dissipação não fotoquímica (NPQ) ao longo dos dias. (B) Média de dissipação não fotoquímica para os dias analisados. (C) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) ao longo dos dias. (D) Média do rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	50
Figura 15. Proporção de centros de reação do PSII “abertos” (qP) e dissipação de energia não radiante em forma de calor (qN). (A) Proporção de PSII “fechado” (qN) ao longo dos dias. (B) Média da proporção de PSII “fechado” (qN) para os dias analisados. (C) Proporção de PSII “aberto” (qP) ao longo dos dias. (D) Média da proporção de PSII “aberto” (qP) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	52

Figura 16. Parâmetros de trocas gasosas. (A) Condutância estomática (g_s) ao longo dos dias. (B) Média da condutância estomática (g_s) para os dias analisados. (C) Transpiração foliar (E) ao longo dos dias. (D) Média da transpiração foliar (E) para os dias analisados. (E) Concentração intercelular de CO_2 (C_i) ao longo dos dias. (F) Média da concentração intercelular de CO_2 (C_i) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	54
Figura 17. Temperatura foliar (T_f , °C). (A) Temperatura foliar (T_f) ao longo dos dias. (B) Média da temperatura foliar (T_f) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	55
Figura 18. Taxa de transporte de elétrons (ETR). (A) Taxa de transporte de elétrons (ETR) ao longo dos dias. (B) Média da taxa de transporte de elétrons (ETR) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).	56
Figura 19. Taxa de assimilação de CO_2 (A). (A) Taxa de assimilação de CO_2 (A) ao longo dos dias. (B) Média da Taxa de assimilação de CO_2 (A) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	57
Figura 20. Parâmetros da eficiência do uso da água (EUA). (A) Taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre condutância estomática (g_s) ao longo dos dias. (B) Média da taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre condutância estomática (g_s) para os dias analisados. (C) Taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre transpiração (E) ao longo dos dias. (B) Média da taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre transpiração (E) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	58
Figura 21. Parâmetros da curva A/ C_i . (A) Respiração diurna (R_d^*). (B) taxa de transporte de elétrons (J). (C) Condutância mesofílica (g_m). (D) Uso de triose-fosfato (TPU). (E) Velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($V_{c_{max}}$) ao longo dos dias. (F) Média da $V_{c_{max}}$ entre os dias. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	60
Figura 22. Número médio de flores por planta ao longo do período avaliado. (A) Número médio de flores por planta durante todo o período de avaliação. (B) Retenção de flores média para os tratamentos aos 14 e 15 dias após a primeira aplicação. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	61
Figura 23. Cinética de proteínas totais ao longo dos dias avaliados. (A) Proteínas totais ao longo dos dias após a primeira aplicação. (B) Proteínas totais ao longo dos dias após a segunda aplicação. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	62
Figura 24. Atividade enzimática do sistema antioxidante e concentração de malondialdeído e peróxido de hidrogênio após a primeira aplicação. (A) Dismutase do superóxido. (B) Glutathione redutase. (C) Catalase. (D) Peroxidase do ascorbato. (E) Malondialdeído. (F) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	63
Figura 25. Atividade enzimática do sistema antioxidante e concentração de malondialdeído e peróxido de hidrogênio após a segunda aplicação. (A) Dismutase do superóxido. (B) Glutathione redutase. (C) Catalase. (D) Peroxidase do ascorbato. (E) Malondialdeído. (F) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	65
Figura 26. Relação entre rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) e Dissipação não fotoquímica (NPQ)	69
Figura 27. Relação entre taxa de assimilação de CO_2 (A) e taxa de transporte de elétrons (ETR)	71
Figura 28. Formação de $O_2^{\cdot-}$ na cadeia de transportadora de elétrons da fotossíntese. Adaptado de (BARBOSA et al., 2014)	73
Figura 29. Funcionamento do aparato fotossintético para plantas controle	77

Figura 30. Proposta de funcionamento do aparato fotossintético para plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS	78
Figura 31. Proposta de funcionamento do aparato fotossintético para plantas sob efeito do fungicida STL+AZT ...	79
Figura 32. Parâmetros fotoquímicos da fluorescência da clorofila <i>a</i> um dia após a imposição dos tratamentos. (A) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro (F_m') um dia após a primeira aplicação. (B) Eficiência quântica máxima do PSII (F_v'/F_m') um dia após a primeira aplicação.	110
Figura 33. Dissipação não fotoquímica um dia após a imposição dos tratamentos. (A) Dissipação não fotoquímica (NPQ) um dia após a imposição dos tratamentos. (B) Média da proporção de PSII “fechado” (q_N) um dia após a imposição dos tratamentos.	110
Figura 34. Relações entre parâmetros fotossintéticos. (A) relação entre A/C_i ao longo dos dias. (B) Média da relação entre A/C_i ao longo dos dias. (C) relação entre Φ_{PSII}/NPQ ao longo dos dias. (D) Média da relação entre Φ_{PSII}/NPQ ao longo dos dias. (E) relação entre A/ETR ao longo dos dias. (D) Média da relação entre A/ETR ao longo dos dias (↓) Momento da imposição dos tratamentos.	111
Figura 35. Eficiência do uso da água. (A) relação entre A e E para inferência da eficiência do uso da água. (B) relação entre A e g_s para inferência da eficiência intrínseca do uso da água.	112
Figura 36. Aspecto das plantas de soja 17 dias após a primeira aplicação	113
Figura 37. Detalhe da fitotoxicidade de PTZ+TFS, 22 dias após a primeira aplicação.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros fotoquímicos (Símbolos e definições).....	34
Tabela 2. Lista e época de imposição dos tratamentos.....	38
Tabela 3. Equações comparativas entre Φ_{PSII} com qP e NPQ com qN	51
Tabela 4. Valores médios de clorofila <i>a</i> [índice falker de clorofila] para produtos e épocas de avaliação.....	87
Tabela 5. Valores médios de clorofila <i>b</i> [índice falker de clorofila] para produtos e épocas de avaliação.....	88
Tabela 6. Valores médios de fluorescência inicial para plantas adaptadas ao escuro [Fo] para produtos e épocas de avaliação.....	88
Tabela 7. Valores médios de fluorescência máxima para plantas adaptadas ao escuro [Fm] para produtos e épocas de avaliação.....	89
Tabela 8. Valores médios de eficiência quântica potencial do PSII [F_v/F_m] para produtos e épocas de avaliação.....	89
Tabela 9. Valores médios de fluorescência inicial para plantas adaptadas ao claro [Fo'] para produtos e épocas de avaliação.....	90
Tabela 10. Valores médios de fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro [Fm'] para produtos e épocas de avaliação.....	90
Tabela 11. Valores médios de eficiência quântica máxima do PSII [F_v'/F_m'] para produtos e épocas de avaliação.....	91
Tabela 12. Valores médios do rendimento quântico efetivo do PSII [Φ_{PSII}] para produtos e épocas de avaliação.....	91
Tabela 13. Valores médios da dissipação não fotoquímica ou dissipação na forma de calor [NPQ] para produtos e épocas de avaliação.....	92
Tabela 14. Valores médios da proporção de centros de reação do PSII “abertos” [qP] para produtos e épocas de avaliação.....	92
Tabela 15. Valores médios da dissipação de energia não radiativa em calor [qN] para produtos e épocas de avaliação.....	93
Tabela 16. Valores médios de condutância estomática [g_s , mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	93
Tabela 17. Valores médios de transpiração [E, mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	94
Tabela 18. Valores médios de concentração intercelular de CO ₂ [C_i , μmol CO ₂ mol ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	94
Tabela 19. Valores médios da temperatura foliar [T_b , °C] para produtos e épocas de avaliação.....	95
Tabela 20. Valores médios da taxa de transporte de elétrons [ETR, μmol m ⁻² s ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	95
Tabela 21. Valores médios da assimilação de CO ₂ [A, μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	96
Tabela 22. Valores médios de eficiência do uso da água [EUA, A/E, μmol CO ₂ (mmol H ₂ O) ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	96
Tabela 23. Valores médios de eficiência intrínseca do uso da água [EUA _i , A/ g_s , μmol CO ₂ (mol H ₂ O) ⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.....	97
Tabela 24. Valores médios de respiração diurna [R_d , μmol m ⁻² s ⁻¹] obtido através da curva A/ C_i para produtos e épocas de avaliação.....	97
Tabela 25. Valores médios da taxa de transporte de elétrons [J, μmol m ⁻² s ⁻¹] obtido através da curva A/ C_i para produtos e épocas de avaliação.....	98

Tabela 26. Valores médios de condutância mesofílica [g_m , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.	98
Tabela 27. Valores médios de uso de triose fosfato [TPU, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.	99
Tabela 28. Valores médios de velocidade máxima de carboxilação da rubisco [$V_{c_{\text{máx}}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.	99
Tabela 29. Valores médios de número médio de flores por planta para produtos e épocas de avaliação.	100
Tabela 30. Valores médios de conteúdo de proteínas totais para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	100
Tabela 31. Valores médios de conteúdo de proteínas totais para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	101
Tabela 32. Valores médios da atividade da dismutase do superóxido [SOD, unidade(SOD)(mg proteína) $^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação. .	101
Tabela 33. Valores médios da atividade da glutathione redutase [GR, $\mu\text{mol(GR)(mg proteína)}^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	102
Tabela 34. Valores médios da atividade da catalase [CAT, $\mu\text{mol(CAT)(mg proteína)}^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	102
Tabela 35. Valores médios da atividade da peroxidase do ascorbato [APX, $\mu\text{mol(APX)(mg proteína)}^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	103
Tabela 36. Valores médios do conteúdo de malondialdeído [MDA, nmol(MDA)(g matéria fresca) $^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	103
Tabela 37. Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio [H_2O_2 , $\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O}_2)(\text{g matéria fresca})^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação. .	104
Tabela 38. Valores médios da atividade da dismutase do superóxido [SOD, unidade(SOD)(mg proteína) $^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	104
Tabela 39. Valores médios da atividade da glutathione redutase [GR, $\mu\text{mol(GR)(mg proteína)}^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	105
Tabela 40. Valores médios da atividade da catalase [CAT, $\mu\text{mol(CAT)(mg proteína)}^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	105
Tabela 41. Valores médios da atividade da peroxidase do ascorbato [APX, $\mu\text{mol(APX)(mg proteína)}^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	106
Tabela 42. Valores médios do conteúdo de malondialdeído [MDA, nmol(MDA)(g matéria fresca) $^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	106
Tabela 43. Valores médios do conteúdo peróxido de hidrogênio [H_2O_2 , $\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O}_2)(\text{g matéria fresca})^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.	107

Tabela 44. Teste de efeito para Φ_{PSII} x NPQ (Rendimento quântico efetivo do PSII versus dissipação não fotoquímica na forma de calor)	107
Tabela 45. Teste de efeito para A x ETR (taxa de assimilação de CO_2 versus taxa de transporte de elétrons).	108
Tabela 46. Teste de efeito para A x E (taxa de assimilação de CO_2 versus transpiração).	108
Tabela 47. Teste de efeito para A x g_s (taxa de assimilação de CO_2 versus condutância estomática).	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ingredientes ativos (Fungicidas):

Estrobilurinas:

QoI's	Fungicidas inibidores da quinona externa (estrobilurinas)
AZI	Azoxystrobina
PR	Piraclostrobina
PC	Picoxistrobina
TFS	Trifloxystrobina
KRES	Kresoxim-metílico

Triazóis e triazolinionas:

DMI's	Fungicidas inibidores da demetilação (triazóis e triazolinionas)
PTZ	Prothioconazol
EPZ	Epoxiconazole

Morfolinas:

SBI's	Fungicidas inibidores da biossíntese de estrol (morfolinas)
-------	---

Carboxamidas:

SDHI's	Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (carboxamidas)
STL	Solatenol (benzovindiflupir)
BOSC	Boscalida

Parâmetros fotossintéticos:

A	Taxa de assimilação de CO ₂ (Fotossíntese)
A _L	Taxa de assimilação de CO ₂ líquida (Fotossíntese Líquida)
E	Transpiração
T _f	Temperatura Foliar
g _s	Condutância estomática
C _i	Concentração intercelular de CO ₂
ETR	Taxa aparente de transporte de elétrons
EUA	Eficiência do uso da água (A/E)
EUA _i	Eficiência intrínseca do uso da água (A/g _s)

Parâmetros sobre fluorescência da Clorofila a:

F _o	Fluorescência inicial para planta adaptada ao escuro (Fluorescência da clorofila apenas com feixe de medida)
F _m	Fluorescência máxima para planta adaptada ao escuro (Fluorescência da clorofila após flash de luz saturante)
F _v	Fluorescência variável para planta adaptada ao escuro (F _v = F _m – F _o)
F _o '	Fluorescência inicial para planta adaptada ao claro
F _m '	Fluorescência máxima para planta adaptada ao claro (Fluorescência da clorofila após flash de luz saturante)

F_v'	Fluorescência variável para planta adaptada ao claro ($F_v' = F_m' - F_o'$)
F_v/F_m	Rendimento quântico máximo do PSII
F_v'/F_m'	Rendimento quântico potencial do PSII
F_s	Fluorescência no estado estacionário
qN	Quenching não fotoquímico
qP	Quenching fotoquímico
NPQ	Quenching não fotoquímico (dissipação em forma de calor)
Φ_{PSII}	Rendimento quântico efetivo do PSII

Parâmetros da curva A/C_i:

Rd	Respiração diurna
J	Taxa de transporte de elétrons (baseado no requerimento de NADPH)
g_m	Condutância mesofílica
TPU	Consumo de triose fosfato
$V_{C_{max}}$	Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco

Complexos proteicos envolvidos nos processos fotoquímicos:

PSII	Fotossistema II
PSI	Fotossistema I
Cyt b ₆ f	Citocromo b ₆ f
PC	Plastocianina
PQ	Plastoquinona
LHCII	Complexo coletor de luz do PSII
D1	Centro de reação do PSII
Qa	Quinona A

Enzimas e outros compostos:

ABA	Ácido abicísico
ACC	ácido-aminociclopropano-carboxílico
NR	Nitrato redutase
SOD	Dismutase do superóxido
POD	Peroxidase
CAT	Catalase
APX	Peroxidase do ascorbato
GR	Glutathione redutase
POX	Peroxidase
MDA	Malondialdeído

Outras abreviaturas e siglas

EROs	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH ⁻	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete

$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
AOX	Respiração alternativa
O_3	Ozônio
e^-	Elétron
H^+	Próton
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de soja (*Glycine max*) para a safra 2017/2018 atingiu 116,996 milhões de toneladas, com uma área plantada de 35,1 milhões de hectares (AMAZONAS, 2018). Com esses números expressivos, o Brasil configura como o segundo maior produtor do grão no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América, com uma produção de 119,518 milhões de toneladas e área plantada de 36,228 milhões de hectares (ASH e MATIAS, 2018).

Ocupando o segundo lugar na produção mundial do grão a produção de soja no Brasil ocupa também um lugar de destaque, sendo um dos cultivos mais importantes para a economia brasileira. Neste contexto, a utilização de defensivos agrícolas vem crescendo à medida que se cresce o interesse por proteger a produção brasileira de possíveis detrações causadas por pragas e doenças.

Dentre os diversos defensivos agrícolas existentes atualmente, uma importante categoria é a dos fungicidas, que na maioria das vezes são recomendados em aplicações preventivas, ou seja, mesmo sem a presença do patógeno alvo. Isso ocorre, pois, alguns fungicidas possuem uma efetividade maior nos estádios iniciais do processo de infecção, o que protege os cultivos contra o ataque de patógenos e consequentemente protege também a produtividade agrícola. Observações mais detalhadas e estudos mais aprofundados sobre os efeitos dos fungicidas sobre os cultivos de interesse comercial revelam efeitos que podem ser tanto positivos quanto negativos da utilização desses produtos, mesmos na ausência dos patógenos alvo (AMARO et al., 2018; BARTLETT et al., 2002; DAREN S. MUELLER, 2007; KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002; VENANCIO et al., 2003)

Nos últimos anos tem crescido o interesse e os estudos sobre esses efeitos “adicionais” causados pela utilização dos fungicidas, mesmo na ausência do patógeno alvo. Esses efeitos vêm sendo atribuído a alterações tanto de ordem fisiológica como bioquímica, podendo levar ao aumento da fotossíntese líquida, caracterizando tanto como um efeito benéfico, como também um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) ocasionando portando um estresse para o cultivo em questão, podendo assim levar a uma redução da assimilação total (DIAZ-ESPEJO et al., 2012).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar alterações de ordem fisiológica relacionadas à fotoquímica e bioquímica da fotossíntese bem como atividade de enzimas do sistema antioxidante provocadas pela aplicação dos fungicidas benzovindiflupir+azoxistrobina (com adjuvante Nimbus à 600 ml/há, conforme recomendação do fabricante) e trifloxistrobina+protioconazol (com adjuvante Aureo à 400 ml/há, conforme recomendação do fabricante), na cultura da soja na ausência de doenças. Os fungicidas utilizados neste estudos foram selecionados por serem na atualidade os principais fungicidas utilizados pelos sojicultores para controle da ferrugem asiática da soja, destacando assim a sua abrangência em área tratada no Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura da Soja

A introdução da cultura da soja no Brasil data de 1901 com início do cultivo pela estação agropecuária de Campinas e extensão a pequenos produtores do estado de São Paulo. A partir da imigração Japonesa no ano de 1908 inicia-se o processo de intensificação do cultivo da soja e em 1914 é oficialmente introduzida no Rio Grande do Sul, estado que possuía características climáticas similares às regiões produtoras dos EUA, origem das primeiras variedades cultivadas no Brasil (BONATO; BONATO, 1987). De lá para cá as variedades e programas de melhoramento foram sendo introduzidos no Brasil e as variedades hoje cultivadas já apresentam grande adaptação às condições de cultivos em diversos estados brasileiros. Esse investimento em programas de melhoramento brasileiros permitiu uma expansão territorial da cultura, a partir do início dos anos 80, para regiões do cerrado, como Mato Grosso, e favoreceu o desenvolvimento de uma nova civilização no centro-oeste do país.

De acordo com o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (AMAZONAS, 2018) realizado em maio de 2018 o Brasil configura como o segundo maior produtor mundial de soja com uma produção de 116,996 milhões de toneladas e área plantada de 35,1 milhões de hectare, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América, com uma produção de 119,518 milhões de toneladas e área plantada de 36,228 milhões de hectares (ASH; MATIAS, 2018). Esse número expressivo em área plantada coloca a soja como a maior cultura em área plantada do país, tendo o milho em segundo lugar com cerca de 11 milhões de hectares e a cana-de-açúcar em terceiro com cerca de 10 milhões de hectares (IBGE – relatório de 12/06/2018).

Ainda segundo o relatório do IBGE de 12/06/2018 a área plantada sofreu um aumento de 2,6% em relação a safra 2016/2017 e de 0,7% em produção nacional. A maior concentração em área plantada do Brasil se encontra no estado do Mato Grosso, com uma estimativa de 9,3 milhões de hectares, o que representa uma produção de 31,4 milhões de toneladas, seguido por Rio Grande do Sul com 5,6 milhões de hectares plantados e Paraná com 5,5 milhões de hectares (IBGE – relatório de 12/06/2018) (Figura 1).

Figura 1. Cartograma de área plantada com soja no Brasil (gerado a partir da plataforma SIDRA-IBGE (<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>)).

Toda essa produção atualmente gerada em âmbito nacional pode ter diversas destinações, o que mantém não apenas o setor do agronegócio fortalecido, como também posiciona o Brasil como um dos principais “players” do agronegócio mundial, favorecendo a uma balança comercial superavitária e suporte à uma economia aquecida em diversos setores (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Devido ao seu valor nutricional e energético a soja pode ser utilizada em diversos setores da economia (Figura 2), aproximadamente 90% dos grãos consumidos são utilizados para o processo de esmagamento, o que gera farelo e óleo de soja em uma proporção próxima a 80/20. Juntamente com o farelo de milho o farelo de soja é o principal produto para fabricação de rações para as mais diversas finalidades (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Além de ser utilizado para a fabricação de rações e conseqüentemente a produção de proteína animal, um de seus componentes, o óleo da soja, extraído nesse processo, assume um papel importante, sendo essencial em diversos setores da economia, utilizado como componentes de gorduras vegetais, óleos de cozinha, temperos para salada, margarinas, maioneses e subprodutos do mercado de carne (APROSOJA, 2014). Outro importante componente extraído da soja é a lecitina, produzida durante o refino do óleo de soja, que é muito utilizada como emulsificante para a produção de sorvetes, achocolatados, barras de cereais e produtos congelados (APROSOJA, 2014).

Mais atualmente outros usos para a soja vêm ganhando importância no cenário nacional e internacional, tais como produtos destinados a pessoas com intolerância a lactose, por exemplo, os sucos, leites e derivados de soja. Outros setores também são importantes consumidores dos produtos e subprodutos de soja, como por exemplo a indústria de cosméticos, farmacêutica, veterinária, tintas e plásticos. Outros setores que também utilizam dessa importante matéria prima são indústria de adesivos, adubos, formuladores de espumas, fabricação de fibras, resvestimentos, papel e emulsificantes de água para tintas (APROSOJA, 2014).

Porém, apesar do agronegócio da soja ser um expoente para um superávit da balança comercial brasileira e para diversos setores da economia, diversos fatores ameaçam uma alavancagem da produção, não apenas no Brasil, mas de uma maneira geral, em todas as regiões produtoras. Dentre os fatores que restringem a produtividade da soja podemos destacar o ataque de pragas e doenças. Atualmente há cerca de 40 doenças que afetam a cultura da soja no Brasil. Dentre as doenças fúngicas encontram-se a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*) que teve seu surgimento em meados dos anos de 1980 e foi a que primeiro causou níveis severos de danos para a cultura. Em meados dos anos 1990 o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis*) foi a doença fúngica que mais se destacou como detratadora da produtividade de soja, outras doenças que também incomodaram os produtores nesse período foram o nematóide do cisto da soja (*Heterodera glucines*) e o oídio (*Erysiphe diffusa*) (PICININI; FERNANDES, 2003; YORINORI, 1997).

A partir da safra 2000/2001 a ocorrência da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em lavouras comerciais foi relatada pela primeira vez. Na safra de 2002/2003 a doença já se encontrava espalhada por todas as regiões produtoras, representando não só uma ameaça para a cultura da soja, mas também uma ameaça a sustentabilidade do cultivo e economia do país, uma vez que seu poder de retração de produtividade pode chegar a 70%.

Figura 2. Destinos da soja no Brasil (Aprosoja, 2014)

A entrada dessa doença fez com que se intensificasse o uso de defensivos agrícolas e aumentasse o investimento em tecnologia na cultura da soja. A partir da intensa expansão da ferrugem asiática para as diversas regiões produtoras do Brasil o uso de fungicidas se intensificou e com o uso cada vez mais crescente, cresce também o interesse por parte dos pesquisadores sobre os efeitos que estes podem causar não apenas para o patógeno alvo, como também para a fisiologia e bioquímica das plantas cultivadas.

2.2. Fungicidas utilizados na cultura da soja

Para combater alta pressão de doenças hoje presentes na cultura da soja e reduzir o impacto na economia nacional e mundial, os agricultores brasileiros dispõem atualmente de 259 fungicidas formulados e que possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (AGROFIT, 2018), porém esse alto número de fungicidas formulados se restringem basicamente a cinco classes químicas: as estrobilurinas (inibidores da Quinona externa – QoI's), triazóis e triazolintionas (inibidores da demetilação – DMI's), morfolidinas (inibidores da biosíntese de esterol – SBI's), carboxamidas (inibidores da succinato desidrogenase – SDHI's) e os multissítios (RODRIGUES, 2006). Cada uma dessas classes de fungicidas possui um mecanismo de ação sobre diferentes processos metabólicos do patógeno alvo.

As estrobilurinas foram inspiradas por um grupo fungicida derivado do ácido β -methoxycrylic, esse grupo fungicida é naturalmente produzidos por basidiomicetos necrotróficos que participam da decomposição de madeira (BARTLETT et al., 2002). A ação fungicida da classe das estrobilurinas deve a sua atividade inibitória sobre a respiração mitocondrial, através da inibição do sítio Qo do citocromo b (complexo III) dentro da cadeia transportadora de elétrons (BARTLETT et al., 2002). Localizado na membrana interna da mitocôndria do patógeno, o complexo III ou complexo do citocromo bc_1 é parte essencial da cadeia transportadora de elétrons, responsável pela produção de ATP e fatores oxidantes que em última instância irão oxidar a glicose e conseqüentemente fornecer energia para o crescimento e desenvolvimento do fungo em questão (TAIZ et al., 2017).

As estrobilurinas atuam bloqueando o transporte de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c_1 , paralisando o transporte de elétrons a nível do complexo III e conseqüentemente bloqueando o processo de fornecimento de energia para crescimento e desenvolvimento do fungo, levando-o a morte (BARTLETT et al., 2002). Uma importante característica dessa classe de fungicidas é sua eficiência particular sobre estádios que demandam altas quantidades de energia, por exemplo, germinação de esporos e crescimento do tubo micelial (BARTLETT et al., 2002), sendo portanto, considerados e manejados como fungicidas preventivos.

Outra classe de fungicidas muito utilizados em diversas culturas, e conseqüentemente no cultivo da soja, são os inibidores da demetilação, ou DMI's. Fazem parte deste grupo de fungicidas os triazóis e as triazolintionas. Diferentes da classe das estrobilurinas, os DMI's atuam sobre uma enzima específica, a C14-demetilase (DAREN S. MUELLER, 2007). Essa enzima participa do processo de síntese de esteróis, que são essenciais para a estabilização da membrana celular (DAREN S. MUELLER, 2007). Sem a produção de esteróis, no caso de fungos patogênicos, os ergosteróis, não há um correto desenvolvimento de membranas celulares funcionais, ocasionando ao fungo um crescimento anormal, levando-os eventualmente a morte (DAREN S. MUELLER, 2007). Uma importante característica desse grupo de fungicidas é a sua baixa atividade sobre os esporos e sua germinação, isso se deve ao fato dos esporos, estruturas de reprodução, conterem quantidade suficiente de esteróis em sua composição para iniciarem o processo germinativo e infeccioso (DAREN S. MUELLER, 2007). Da mesma maneira, esses fungicidas não serão efetivos durante o processo de esporulação, uma vez que depois de formados os esporos, os fungos já possuem

ergosterol suficiente para reiniciar o processo de colonização e germinação. Portanto os DMI's são geralmente recomendados para aplicações curativas, porém para momentos de início do processo infeccioso.

Assim como os triazóis as morfolinas também atuam sobre a síntese de ergosterol, porém, neste caso, o mecanismo de inibição ocorre em outra etapa da reação de síntese de esteróis (PHYTUS, 2018). Por esse motivo as morfolinas são classificadas como sendo um mecanismo de ação diferente dos triazóis e podem ser utilizadas como alternativas para o manejo de resistência de patógenos a fungicidas. Porém as mesmas características dos triazóis podem ser expandidas para o grupo das morfolinas.

As carboxamidas atuam interferindo na respiração mitocondrial do patógeno, mais especificamente sobre o complexo II, ou complexo succinato desidrogenase, bloqueando a cadeia transportadora de elétrons. Sem a presença do fungicida do grupo das carboxamidas, o complexo II é responsável pelo processo de transporte de elétrons entre o aceptor de elétrons FAD e a Coenzima Q, tendo como intermediário o FADH₂. As carboxamidas atuam nesse processo inibindo o transporte de elétrons entre FAD e a Coenzima Q, bloqueando assim a respiração mitocondrial e conseqüentemente a geração de energia para o fungo, levando-o a morte (AMARO et al., 2018).

Por último dentre as cinco classes de fungicidas mais utilizadas pelos agricultores, encontramos os fungicidas multissítio, diferentes das outras classes de fungicidas, os multissítios são fungicidas de contato e permanecem na superfície das plantas após a aplicação (DAREN S. MUELLER, 2007). Esse grupo de fungicidas atua interferindo em diversos sítios bioquímicos e são efetivos por praticamente envenenar os patógenos (DAREN S. MUELLER, 2007). Esses fungicidas possuem um amplo espectro de atuação, pois, por interferirem em muitos processos bioquímicos, acabam por atuarem em diversos grupos de patógenos diferentes. Porém são fungicidas estritamente preventivos, não possuindo ação sobre o patógeno após a infecção (DAREN S. MUELLER, 2007).

Como abordado e explanado acima, o correto manejo para utilização dos fungicidas obrigatoriamente passa por aplicações de maneira preventiva, ou seja, aplicações mesmo sem a presença do patógeno alvo. Isso ocorre, pois, após o início do processo infeccioso inicia-se também a perda de produtividade, uma vez que o patógeno passa a utilizar-se dos fotoassimilados da planta para seu crescimento e desenvolvimento, extraindo assim uma substancial quantia de energia que poderia ser utilizada para compor a produtividade da cultura.

Outrossim, uma parcela das culturas tratadas com fungicidas não sofrem com o ataque de patógenos ou mesmo a pressão exercida por estes é muito baixa. Diversas observações e estudos tem demonstrado que essas aplicações de fungicidas, quase sempre de maneira preventiva, podem interferir nos processos fisiológicos e bioquímicos da cultura tratada (AMARO et al., 2018; BARTLETT et al., 2002; DAREN S. MUELLER, 2007; KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002; VENANCIO et al., 2003), beneficiando o desenvolvimento e formação da produtividade da planta ou até mesmo vindo a causar um efeito prejudicial para o cultivo em questão.

2.2.1. Fungicidas com efeitos fisiológicos positivos

A ação de fitopatógenos interfere diretamente na eficiência produtiva das culturas, reduzindo tanto a área fotossinteticamente ativa e a taxa de translocação de assimilados, como interferindo diretamente na fisiologia e metabolismo das plantas, sendo que a aplicação de fungicidas visa prevenir esses distúrbios metabólicos diretos (VENANCIO, W S; RODRIGUES, M A T; BEGLIOMINI, E; SOUZA, 2003). Além dos benefícios obtidos com a inibição da ação fúngica sobre as plantas, os fungicidas podem ter também um efeito positivo sobre outros processos

metabólicos, levando a aumento de produtividade mesmo quando não são observadas presença de fungos fitopatogênicos.

A classe fungicida das estrobilurinas é um grupo muito estudado pelos seus efeitos positivos sobre o metabolismo da planta tratada. Sua seletividade de ação está mais correlacionada com a biodisponibilidade e abundância do princípio ativo no local de ação, do que com a complexidade ou organismo onde as mitocôndrias estão presentes (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M.; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002). Nesse sentido é esperado que, pelo modo de ação das estrobilurinas sobre a respiração, haja tanto um bloqueio da cadeia transportadora de elétrons dos fungos fitopatogênicos, como também sobre as mitocôndrias das plantas que são tratadas com essa classe de fungicidas (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M.; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002). Portanto assim como ocorre nos fungos fitopatogênicos, a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria das plantas também pode sofrer com a ação desta classe de fungicidas (BERTELSEN; DE NEERGAARD; SMEDEGAARD-PETERSEN, 2001), causando, neste caso, efeitos benéficos com melhorias à produtividade (BERTELSEN; DE NEERGAARD; SMEDEGAARD-PETERSEN, 2001).

O benefício causado pela aplicação das estrobilurinas é explicado em grande parte, pois, uma fitotoxicidade causada pelo bloqueio transiente da cadeia transportadoras de elétrons é determinada pela importância dessa organela no suprimento de energia, o que pode variar com condições ambientais e estágio de desenvolvimento do organismo (SAUTER et al. 1995). Esse bloqueio transiente da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria pode ser convertido em alterações metabólicas positivas, visto que plantas superiores possuem outra organela, o cloroplasto, que atua também no fornecimento energético. Essas alterações podem ser atribuídas em primeira instância ao aumento do ponto de compensação de CO₂. Estudos demonstram que uma inibição da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria das plantas tratadas pela aplicação de estrobilurinas induz um aumento da concentração de prótons (H⁺) no citossol, assim como um aumento transitório na rota alternativa da respiração (AOX). Esses dois fatores induzem um aumento na atividade da enzima nitrato redutase e consequentemente aumento da assimilação líquida (A_L) e produtividade (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M.; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002).

Dentre as formas de nitrogênio encontradas no meio ambiente, o nitrato é sem dúvidas a maior e mais abundante fonte de nitrogênio para plantas superiores (YANG; MIDMORE, 2005). Neste contexto, a enzima nitrato redutase atua no primeiro passo de assimilação de nitrogênio, catalizando a redução de nitrato a nitrito (YANG; MIDMORE, 2005). Essa etapa do processo de assimilação de N é considerada como a etapa limitante na aquisição desse nutriente e por esse motivo é altamente regulada (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M.; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002). Por ser a etapa limitante no processo de aquisição de N pela planta, a atividade da nitrato redutase é diretamente coordenada com a assimilação de carbono. Com o aumento da atividade da nitrato redutase induzido pelo aumento de prótons (H⁺) no citossol e aumento da rota alternativa da respiração (AOX), ocasionado pela aplicação de estrobilurinas, há também um aumento coordenado da assimilação líquida (A_L) evitando assim um excesso de nitrito tóxico (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M.; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002).

Esse aumento na assimilação líquida (A_L) e na atividade da nitrato redutase podem levar a alterações no metabolismo celular. Alguns dos efeitos observados foram retenção prolongada de folhas verdes, alteração do ponto de compensação de carbono, aumento na concentração de clorofila, aumento da atividade fotossintética, abertura estomática, aumento na eficiência do uso da água, aumento na atividade de enzimas antioxidantes, diminuição nos

níveis endógenos de ácido abscísico (ABA), atividade da enzima nitrato redutase e aumento de produtividade (BARTLETT et al., 2002; BERTELSEN; DE NEERGAARD; SMEDEGAARD-PETERSEN, 2001).

Além da ação sobre a atividade da nitrato redutase, outros experimentos demonstram alterações também em outros processos metabólicos. Experimentos com dose resposta de estrobilurinas demonstraram uma alteração do balanço hormonal com aumento de citocinina e diminuição de etileno, levando a um aumento dos níveis endógenos de ABA (DIAZ-ESPEJO et al., 2012).

Em estudo com a cultura do trigo foi demonstrado que a aplicação de estrobilurina aumentou a produtividade e a qualidade do grão colhido, através do aumento da área verde fotossinteticamente ativa, e em última análise, através da inibição da respiração celular, favorecendo a fixação de carbono (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997). Ainda neste estudo a alteração mais marcante foi a inibição da biossíntese de etileno, sendo que a ação principal do fungicida foi observada na diminuição da taxa de converção de S-adenosilmetionina em ácido-aminociclopropano-carboxílico (ACC). A estrobilurina nesse estudo inibiu efetivamente a atividade da ACC sintase, interferindo na indução dessa rota metabólica, que em última análise diminuiu também a síntese de etileno, uma vez que o ACC é um dos substratos para a síntese desse hormônio (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997).

Em condições naturais o aumento do etileno em plantas superiores é uma resposta a diversos estímulos ambientais estressantes, podendo ser de ordem abiótica (temperaturas extremas, seca, excesso de água, injúrias, químicos) ou biótica (infecção por patógenos e danos por insetos). Além de uma resposta a estresses ambientais o etileno participa também da regulação de outros processos metabólicos, como crescimento, desenvolvimento, maturação do fruto e aceleração da senescência. Outrossim, a inibição da biossíntese deste hormônio sob efeito dos fungicidas da classe das estrobilurinas, pode favorecer a fixação de carbono e prolongar o período com folhas verdes em detrimento à senescência (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997). Outro importante aspecto observado foi a redução da perda de clorofila durante o processo de senescência causada por essa classe de fungicidas (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997).

Uma vez que o etileno é um importante componente na regulação da biossíntese de citocininas, participando do estímulo à atividade da citocinina oxidase, uma diminuição da quantidade de etileno pode levar a um aumento da concentração de citocininas, o que em última instância pode explicar a pigmentação verde escura das folhas (efeito verde) observada após a utilização desse grupo de fungicidas (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997).

Outros pesquisadores demonstraram, usando como parâmetro o conteúdo de clorofila total, que a aplicação da estrobilurina kresoxim-metílico (KRES) retardou efetivamente a senescência de plantas de trigo, sendo que plantas tratadas possuíam níveis 83% maiores de clorofila quando comparadas com as plantas controle (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; CASPAR, 1999). O KRES também foi capaz de reduzir a síntese de etileno em 60% através da inibição da síntese da ACC sintase (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; CASPAR, 1999). Com a diminuição da síntese de etileno outros efeitos sobre o balanço hormonal puderam ser observados, tais como o aumento em 3 vezes na quantidade de um tipo de citocinina, outrossim a quantidade endógena de ácido abscísico (ABA) aumentou em 223% (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; CASPAR, 1999).

Ainda é incerto se as estrobilurinas atuam diretamente em outros processos fisiológicos e metabólicos que não sobre a atividade respiratória da mitocôndria (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M;; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002). Nesse contexto KÖHLE et al. (2002) propõe um modelo para explicar e integrar os efeitos das estrobilurinas sobre a fisiologia e metabolismo das plantas (Figura 3), propondo também que as mitocôndrias são organelas sensoras chaves na interpretação e atuação sobre períodos de estresse.

Esses efeitos fisiológicos em plantas superiores não são atribuídos unicamente aos fungicidas do grupo das estrobilurinas, evidências demonstram que o fungicida Epoxiconazol (EPZ), pertencente ao grupo dos triazóis (Inibidores da demetilação – DMI's), também possui certa atividade sobre a retenção de folhas verdes e aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante (WU; VON TIEDEMANN, 2001, 2002).

Figura 3. Modelo de ação das estrobilurinas sobre a fisiologia e metabolismos das plantas (KÖHLE, H; GROSSMANN, K; JABS, T; GERHARD, M; KAISER, W; GLAAB, J; CONRATH, U; SEEHAUS, K; HERMS, 2002).

Outra classe de fungicidas que pode complementar a atividade das estrobilurinas sobre os efeitos fisiológicos e bioquímicos das plantas tratadas são as carboxamidas (AMARO, 2011). Esse efeito das carboxamidas pode ser atribuído ao modo de ação sobre a mitocôndria. Assim como as estrobilurinas, as carboxamidas atuam sobre a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, porém essas interferem no complexo III, ou complexo da succinato desidrogenase, diferindo daquelas que atuam sobre o complexo II, ou complexo citocromo bc_1 .

Em estudo sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas das estrobilurinas e carboxamidas, aplicadas de maneira isolada ou em mistura concluiu-se que a aplicação de piraclostrobina (PRS), azoxistrobina (AZT) ou da carboxamida boscalida (BOSC) de maneira isolada, assim como a aplicação PRS+BOSC incrementaram a atividade da nitrato redutase aos 35 e 57 dias após a imposição dos tratamentos quando comparados com as plantas de pepino controle (AMARO, 2011).

Assim como para a atividade da enzima nitrato redutase, PRS, AZT e BOSC foram eficientes em aumentar a atividade do sistema antioxidante, comprovando sua atividade como protetores contra estresse oxidativo (AMARO, 2011). A enzima dismutase do superóxido (SOD) teve aumento significativo observado para todos os tratamentos aos 57 e 73 dias após a aplicação, sendo que aos 57 dias após a aplicação também se observou um aumento significativo para as enzimas, POD e CAT.

2.2.2. Estresse oxidativo e impactos dos fungicidas

No metabolismo vegetal, sob condições normais de crescimento e desenvolvimento, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são importantes mensageiros, reguladores do metabolismo redox e dos mais diversos processos biológicos. Esses mensageiros (EROs) são produzidos de maneira endógena por diversas organelas celulares, principalmente aquelas com sistemas de transporte de elétrons, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Porém, a quantidade de EROs produzida deve ser rigorosamente regulada dentro do metabolismo vegetal. Esse rigoroso processo de regulação é importante uma vez que altas concentrações de EROs podem ocasionar severos danos oxidativos à célula vegetal, como desnaturação proteica, peroxidação de lipídeos e degradação de nucleotídeos, levando em última instância a morte celular (RAJA et al., 2017).

Dentre as espécies reativas de oxigênio originadas como subproduto do metabolismo celular, podemos encontrar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$), oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) entre outros (MITTLER, 2017). Durante o curso da evolução as plantas ajustaram seu metabolismo para evitar concentrações letais de EROs assim como utilizaram essas moléculas no metabolismo para que estas funcionassem como mensageiros, principalmente durante períodos de estresse (RAJA et al., 2017). Desta forma um desbalanço entre a produção de EROs e o consumo dessas moléculas podem levar a danos severos em membranas, DNA e ocasionalmente a morte celular (RAJA et al., 2017).

O aumento de EROs em plantas sob qualquer tipo de estresse pode causar efeitos visuais chamados de manchas foliares, que são pontos necróticos que surgem em decorrência da oxidação causadas pelos EROs nas membranas e outras estruturas celulares. Diversos trabalhos sugerem que a utilização de fungicidas, mesmo na ausência de patógenos, podem reduzir os danos causados por estresse e aumento do conteúdo de EROs em plantas sob estresse ou não. Esses trabalhos são conclusivos sobre a ação de fungicidas no aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e redução do conteúdo de EROs nas plantas (Figura 4) (KANUNGO; JOSHI, 2014).

WU e VON TIEDEMANN. (2001), em estudo sobre a senescência de trigo concluíram que a aplicação de azoxistrobina (AZT) e epoxiconazole (EPZ) retardaram a degradação da quantidade total de proteína e assim retardaram o período de senescência, mantendo uma área verde fotossinteticamente ativa por mais tempo. Outro importante aspecto afetado pelos tratamentos com AZT e EPZ em comparação as plantas controle foi a diminuição e retardamento do extravasamento eletrolítico durante os períodos finais de senescência (WU; VON TIEDEMANN, 2001). Além dos efeitos já citados, os fungicidas AZT e EPZ foram capazes de atuar sobre o sistema de enzimas antioxidantes das plantas de trigo. Durante o processo de senescência há um aumento natural de $O_2^{\cdot-}$, tanto em plantas

tratadas com fungicidas como em plantas controle. A aplicação dos fungicidas foi capaz de retardar esse aumento de O_2^- , sendo que o AZT se mostrou significativamente superior neste aspecto ao fungicida EPZ e ambos foram mais eficazes que as plantas controle (WU; VON TIEDEMANN, 2001).

Figura 4. Efeitos da aplicação de estrobilurina sobre etileno e enzimas do sistema antioxidante (KANUNGO; JOSHI, 2014)

Além de atuarem na diminuição de O_2^- , AZT e EPZ foram capazes de duplicar os níveis da atividade da peroxidase (POX), sendo que em alguns momentos do desenvolvimento AZT foi capaz de quadruplicar a atividade dessas enzimas (WU; VON TIEDEMANN, 2001). Durante a senescência, AZT foi capaz, também, de aumentar fortemente a atividade da dismutase do superóxido (SOD), particularmente nos estádios finais de desenvolvimento, como consequência observou-se que AZT foi capaz de quase prevenir a queda dessa enzima (WU; VON TIEDEMANN, 2001).

Em outro estudo WU e VON TIEDEMANN (2002), concluíram que AZT e EPZ foram capazes de reduzir as injúrias causadas por doses tóxicas de ozônio (O_3) em 50 a 60% em folhas de cevada de inverno. Os fungicidas AZT e EPZ demonstraram ser capazes de atuar efetivamente sobre o sistema antioxidante das plantas de cevada, aumentando a atividade das enzimas, dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), e glutatona redutase (GR) em 16, 75, 51 e 144% respectivamente (WU; VON TIEDEMANN, 2002). Adicionalmente AZT aumentou a atividade da enzima guaiol peroxidase (POX) em 110% quando comparado com as plantas controle (WU; VON TIEDEMANN, 2002). Essa elevação das atividades das enzimas do sistema antioxidante repercutiram sobre os níveis de O_2^- tóxico, sendo que os dois fungicidas reduziram drasticamente a quantidade de O_2^- quando comparados com o tratamento controle (WU; VON TIEDEMANN, 2002). Plantas tratadas com EPZ apresentaram níveis mais elevados de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), estando, portanto, em linha com a elevação da atividade da SOD, porém plantas tratadas com AZT não apresentaram essa elevação, mostrando que provavelmente a atividade da CAT nas plantas tratadas com esses fungicidas obtiveram maiores níveis que as plantas tratadas com EPZ (WU; VON TIEDEMANN, 2002).

Observa-se que uma ativação do sistema antioxidante de plantas superiores por parte de fungicidas é benéfico para combater espécies reativas de oxigênio (EROs), porém esse dispêndio de energia deve ser concomitante com uma manutenção da quantidade de proteínas totais das folhas. A fumigação com doses tóxicas de O_3 também levou a um aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante nas plantas controle, porém observou-se três dias após a fumigação uma queda da quantidade total de proteínas, com consequente queda na atividade das enzimas

desse sistema, causando assim injúrias severas às plantas submetidas à este tipo de estresse (WU; VON TIEDEMANN, 2002).

Uma evidência relevante nesse sentido foi obtida por LIANG, XU e LU (2018), onde plantas de ginseng tratadas com o fungicida azoxistrobina (AZT) apresentaram uma elevação no conteúdo total de proteínas solúveis. Segundo os autores o conteúdo total de proteínas solúveis tende a diminuir com o envelhecimento das plantas, porém, a aplicação de AZT retardou significativamente a redução deste parâmetro (LIANG; XU; LU, 2018). Além de retardar a diminuição no conteúdo total de proteínas solúveis LIANG; XU; LU (2018) observaram uma dose resposta com o incremento de dose de AZT, sendo que a aplicação de 225 gi.a./ha (gramas de ingrediente ativo por hectare) manteve um nível de proteínas totais significativamente maior que a aplicação de 150 gi.a./ha.

Ainda neste estudo LIANG, XU e LU (2018) constataram que a aplicação de AZT foi capaz de reduzir a quantidade total de Malondialdeído (MDA), assim como reduzir significativamente a concentração de O_2^- , mostrando que AZT pode reduzir efetivamente o conteúdo dessa espécie reativa de oxigênio. Assim como demonstrado em outros trabalhos AZT contribuiu significativamente para o aumento das enzimas do sistema antioxidante (LIANG; XU; LU, 2018). Observou-se nesse trabalho que a atividade da dismutase do superóxido (SOD) aumentou entre 100 até 300% dependendo do estágio de desenvolvimento das plantas de ginseng, e a atividade da catalase (CAT) aumentou 2,33 vezes quando comparado com as plantas controle (LIANG; XU; LU, 2018). Seguindo a mesma tendência que a CAT a APX e a POD aumentaram significativamente com a aplicação do fungicida AZT (LIANG; XU; LU, 2018). Além desse aumento de atividade em relação às plantas controle, o parâmetro que mais chama a atenção no trabalho é que durante o envelhecimento a atividade dessas enzimas tende a diminuir durante o início da senescência, porém em plantas tratadas com AZT, essa diminuição de atividade ocorreu de maneira muito mais lenta, provavelmente devido a uma manutenção do conteúdo de proteínas totais, o que leva a um retardamento da senescência e consequentemente manutenção de folhas e área verde fotossintetizante (LIANG; XU; LU, 2018).

2.3. Alterações de ordem fotossintética

2.3.1. Trocas Gasosas

A fenda estomática ou estômato é uma das mais importantes estruturas presentes na morfologia de plantas superiores. Essa importância é caracterizada pelo fato de a fenda estomática ser o principal meio de comunicação e trocas gasosas entre a câmara subestomática ou os espaços intercelulares e o meio externo (TAIZ et al., 2017). A maioria das folhas de plantas superiores é revestida por uma camada cerosa denominada cutícula, que possui como principal atributo ser praticamente impermeável à água (TAIZ et al., 2017), deste modo a maior parte da difusão de vapor d'água se dá através da fenda estomática.

Por apresentarem uma rota de baixa resistência à difusão de gases, os estômatos são os principais meios de difusão de CO_2 e vapor de água (TAIZ et al., 2017). Portanto, uma regulação da abertura dessa fenda, que pode ser denominada como condutância estomática (g_s), afeta a concentração intercelular de CO_2 (C_i) e regula processos como perda de água por transpiração (E) (TAIZ et al., 2017). Uma relação positiva entre g_s , C_i e E já foi muito bem estabelecida (WONG; COWAN; FARQUHAR, 1985, 1979).

Estudos correlacionando trocas gasosas e aplicação de fungicidas da classe das estrobilurinas sugerem que tais substâncias podem regular e melhorar o status hídrico, eficiência do uso da água (EUA) e eficiência fotossintética

das plantas através da regulação da condutância estomática e perda de água através do estômato em plantas sob estresse hídrico (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

Em experimentos conduzidos com trigo, cevada e soja a aplicação de estrobilurinas causou uma diminuição transiente da condutância estomática e consequentemente na taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração e concentração intercelular de CO₂ (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). Ainda nesse estudo foi comprovada a melhora na eficiência do uso da água (EUA) uma vez que o tratamento com estrobilurinas diminuiu em maior proporção a transpiração quando comparado com a taxa de assimilação líquida de CO₂ (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

Em trigo e cevada foi demonstrado que a aplicação de estrobilurinas aumenta a EUA tanto em condições de déficit hídrico como para plantas bem hidratadas (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007), demonstrando que a regulação da condutância estomática ocasionada pela aplicação de fungicidas pode aumentar a eficiência fotossintética das plantas (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). O uso dessa classe de fungicidas pode ser benéfico tanto para situações de estresse hídrico como para plantas bem hidratadas, no entanto, o foco aqui seja primordialmente o controle de fungos fitopatogênicos.

Em estudo com dose resposta em plantas de trigo foi constatado que a aplicação de piraclostrobina (PRS) e picoxistrobina (PCS) reduziu g_s, E e A sem, no entanto, afetar C_i (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). Entretanto em uma análise mais detalhada concluiu-se que para PCS houve um aumento da EUA 2 dias após a aplicação até a dose de 0,75 mM mantendo-se estável com aumentos gradativos de dose. Para PRS não foi observado o mesmo efeito na melhoria desse parâmetro (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). Ainda neste trabalho comprovou-se que há relação dose-resposta nos parâmetros fisiológicos para aplicações de estrobilurina (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

Comparando o efeito fisiológico sobre trocas gasosas de cinco estrobilurinas (azoxistrobina – AZT, Kresoxim-metilico – KRES, Picoxistrobina – PCS, Piraclostrobina – PRS e trifloxistrobina – TFS) e um triazol (Epoxisconazole – EPZ) em plantas de trigo sob déficit hídrico e bem hidratadas, A. Nason, Farrar e Bartlett (2007) concluíram que aos 7 dias após a aplicação as plantas tratadas com estrobilurinas não diferiram estatisticamente das plantas controle em condutância estomática (g_s), entretanto aos 14 dias após a aplicação, PRS reduziu este parâmetro em aproximadamente 56±10% quando comparado as plantas controle (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). Apesar da aplicação dos tratamentos não ter interferido na condutância estomática, a eficiência do uso da água (EUA) foi diretamente afetada em favor das plantas que receberam aplicações das estrobilurinas. AZT apresentou estatisticamente a maior EUA aos 7 dias após a aplicação quando comparado com os outros tratamentos e as plantas controle, TFS melhorou a EUA aos 1 e 3 dias após a aplicação e PRS se diferenciou estatisticamente aos 3 dias após a aplicação quando comparados com as plantas controle (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

Com relação a mobilidade das estrobilurinas (AZT, PCS e PRS) (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007) concluíram que a aplicação controlada de AZT e PCS na base das folhas de cevada alterou significativamente g_s, E, A e C_i em porções superiores da mesma folha tratada com estes fungicidas, sem haver, no entanto, alterações destes parâmetros nas plantas controle. Uma redução proporcional para E em relação a A foi observada, o que resultou em uma maior EUA para as plantas tratadas com esses fungicidas. Esse efeito de redução na condutância estomática para as plantas tratadas com estrobilurina foi observado nas porções distantes da folha a partir de 30 minutos mantendo-se até 5 horas após a aplicação. A aplicação de PRS na base de folhas de trigo também ocasionou uma redução da condutância estomática (g_s), taxa de assimilação de CO₂ (A), transpiração (E) e concentração intercelular de CO₂ (C_i), porém neste caso o início do declínio foi observado apenas 45 minutos com duração máxima de 2,5 horas após a

aplicação (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007). Esses resultados indicam que AZT e PCS possuem uma maior mobilidade através do xilema que a PRS, porém este fungicida, apesar de ter uma mobilidade limitada, ainda possui certa movimentação translaminar em folhas de trigo (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

Amaro (2011) demonstrou que a atividade das estrobilurinas sobre os efeitos fisiológicos e bioquímicos das plantas tratadas podem ser complementadas pela atividade das carboxamidas, quando aplicadas de maneira alternadas à estrobilurinas ou em aplicações concomitantes.

Segundo o mesmo trabalho, plantas de pepino tratadas com as estrobilurinas piraclostrobina (PRS), azoxistrobina (AZT) e a carboxamida boscalida (BOSC) de maneira isolada apresentaram aos 35, 57 e 73 dias após o tratamento uma maior A além de uma maior relação A/Ci.

2.3.1. Fluorescência da clorofila *a*

Com o advento de novas tecnologias e equipamentos portáteis, a utilização do estudo de fluorescência vem se tornando cada vez mais frequente, sendo que atualmente o estudo de plantas sob estresse obrigatoriamente deve passar pela investigação dos caminhos de dissipação de energia em plantas (BAKER, 2008; MAXWELL; JOHNSON, 2000). A energia absorvida pela clorofila nas folhas de plantas pode seguir um de três caminhos que competem entre si: dissipação fotoquímica (utilização para produção de fotoassimilados), dissipação em forma de calor ou dissipação na forma de re-emissão de luz, ou seja, fluorescência da clorofila (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Neste contexto, a energia total absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, as clorofilas, deve sempre seguir um destes três caminhos, ou seja, o aumento em uma das formas de dissipação obrigatoriamente resultará na diminuição da energia disponível para dissipação nos outros dois caminhos possíveis a serem seguidos (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A utilização dos dados referentes a quantidade de energia dissipada na forma de re-emissão luminosa, fluorescência da clorofila, pode nos dar informações relevantes quanto a quantidade de energia disponibilizada para a dissipação fotoquímica (MAXWELL; JOHNSON, 2000), nos permitindo inferir a eficiência no uso da energia luminosa utilizada no processo fotoquímico, e portanto a eficiência do fotossistema II (PSII) (BAKER, 2008).

O processo de quantificação da fluorescência da clorofila se dá de maneira muito fácil, uma vez que o comprimento de onda da fluorescência é maior que o comprimento de onda da energia absorvida (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Isso ocorre, pois, no processo de re-emissão luminosa há uma perda de energia na forma de calor, aumentando, portanto, o comprimento de onda e deslocando-a para uma faixa diferente da energia absorvida (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

As primeiras observações no rendimento da fluorescência da clorofila foram realizadas por Kautsky e colaboradores em 1960, estes autores observaram que no primeiro segundo após um pulso saturante de energia luminosa em plantas adaptadas ao escuro, a fluorescência da clorofila tinha um pico máximo (Fluorescência máxima adaptada ao escuro – F_m) com consequente redução dessa dissipação máxima ao longo do tempo, estabilizando em torno de 15 a 20 minutos (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Esse pico máximo no rendimento da fluorescência da clorofila com consequente redução ao longo do tempo é explicado seguindo a rota de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons presente no cloroplasto. Milésimos de segundos após a exposição ao pulso saturante de energia luminosa, a energia absorvida é utilizada em um primeiro momento na forma de dissipação fotoquímica, ou seja, a energia é utilizada para desencadear o processo natural de transporte de elétrons, removendo um elétron do centro de reação do PSII e transferindo-o para seu primeiro aceptor, a quinona A ou Q_a , porém este aceptor só se

tornará apto a receber um segundo elétron do PSII após transferir o primeiro para o acceptor seguinte na cadeia transportadora de elétrons (TAIZ et al., 2017). Neste curto período de tempo os centros de reação são ditos como estando “fechados”, pois não estão aptos a receberem outro elétron para dar continuidade ao processo de transporte de elétrons (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Com os centros de reação “fechados” a energia luminosa incidente e absorvida pela clorofila deve seguir outro caminho de dissipação, aumentando assim o rendimento da fluorescência da clorofila e atingindo no primeiro segundo um pico de rendimento máximo (F_m) (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Com o passar desse primeiro instante ocorre a continuidade do processo de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e os centros de reações vão se tornando gradativamente “abertos” dando fluidez para a dissipação fotoquímica e consequentemente para o processo de fotossíntese (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Ao mesmo tempo durante o processo de transferência de elétrons há também um aumento na perda de energia na forma de calor, gerando uma dissipação de energia, denominada de dissipação não fotoquímica (MAXWELL; JOHNSON, 2000), ou “Non Photochemical Quenching” (NPQ) do inglês.

Essa dissipação em forma luminosa da fluorescência da clorofila máxima (F_m), onde a energia absorvida está quase que na sua totalidade sendo dissipada desta forma em detrimento dos outros dois caminhos de dissipação, nos remete a informações sobre a capacidade energética máxima dos pigmentos fotossintéticos em estudo (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Com essa informação em mãos, assim como a informação da fluorescência no estado estacionário (F_s), em plantas adaptadas a luz, ou em outros termos, plantas adaptadas ao claro, podemos inferir sobre a saúde e eficiência do aparato fotossintético, mais especificamente a eficiência do PSII (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Em resumo podemos ter diferentes parâmetros no estudo da fluorescência da clorofila, que nos auxiliam a interpretar a eficiência do PSII em estudo. Estes parâmetros são definidos segundo a condição de adaptação à luz ou ao escuro com relação ao momento em que são tomadas as medidas. Deste modo temos para plantas previamente adaptadas ao escuro, fluorescência da clorofila inicial (F_o), que se refere a fluorescência inicial na ausência de energia luminosa incidente, e fluorescência da clorofila máxima (F_m), que se refere ao rendimento da fluorescência da clorofila no pico após um pulso de energia saturante. Estes mesmos parâmetros são tomados para plantas adaptadas ao claro, sendo denominados, fluorescência inicial para plantas adaptadas ao claro (F_o') e fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro (F_m'). Um último parâmetro tomado dentro do estudo da fluorescência da clorofila é a fluorescência no estado estacionário (F_s), ou seja, a dissipação em forma de fluorescência para plantas adaptadas ao claro, porém neste caso sem a imposição de um pulso saturante de energia luminosa.

Com base nestes cinco parâmetros tomados com o auxílio de fluorômetros é possível desenvolver inferências segundo a eficiência fotossintética do PSII, conforme segue na Tabela 1, adaptado de (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Com os parâmetros descritos e calculados (Tabela 1) e assumindo algumas premissas é possível ainda calcular outros importantes parâmetros fotoquímicos, como a taxa efetiva de transporte de elétrons (ETR). Esse cálculo assume valores como o rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD), a absorbância fracionária de luz pela folha (α_{leaf}), que de maneira geral girou em torno de 0,87. O fator de 0,5 utilizado na fórmula refere-se ao particionamento da luz absorvida entre o PSII e o PSI (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Tabela 1. Parâmetros fotoquímicos: Símbolos, definições e fórmulas.

SÍMBOLO	PARÂMETRO FOTOQUÍMICO	FÓRMULA
F_V	Fluorescência variável de plantas adaptadas ao escuro	$F_m - F_o$
F_V'	Fluorescência variável de plantas adaptadas ao claro	$F_m' - F_o'$
F_V/F_M	Eficiência quântica potencial do PSII	$(F_m - F_o)/F_m$
F_V'/F_M'	Eficiência quântica máxima do PSII	$(F_m' - F_o')/F_m'$
Φ_{PSII}	Rendimento quântico efetivo do PSII	$(F_m' - F_s)/F_m'$
NPQ	Dissipação não fotoquímica (calor)	$(F_m - F_m')/F_m'$
q_P	Proporção de centros de reação do PSII “abertos”	$(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$
q_N	Dissipação de energia não radiativa em calor	$(F_m - F_m')/(F_m - F_o)$
ETR	Taxa efetiva de transporte de elétrons	$\Phi_{PSII} * PPFD * \alpha_{leaf} * 0,5$

Evidências e resultados com a aplicação do fungicida azoxistrobina (AZT) em plantas de ginseng demonstram que o conteúdo total de clorofila pode aumentar em todas as fases de desenvolvimento da cultura quando comparados com as plantas controle, não tratadas com o fungicida (LIANG; XU; LU, 2018). Neste mesmo estudo constatou-se que a aplicação de 150 g i.a./ha do fungicida AZT aumentou o conteúdo de clorofila em 1,5 a 2,2 vezes em relação as plantas controle e para a dose de 225 g i.a./ha aumentou esse mesmo parâmetro em 2,58 a 2,68 vezes quando comparados com as plantas controle (LIANG; XU; LU, 2018). Esse resultado sugere que AZT pode ter um efeito sobre o conteúdo total de clorofila das folhas de ginseng, melhorando assim a eficiência na interceptação, absorção e utilização da radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Outrossim, com o aumento do conteúdo de clorofila ocasionado pela aplicação de fungicidas da classe das estrobilurinas, neste estudo o AZT, pode-se esperar uma alteração na eficiência na utilização luminosa e assim alteração na eficiência do PSII e outros parâmetros relacionados a fluorescência da clorofila *a*.

A aplicação de picoxistrobina (PCS) e piraclostrobina (PRS) em plantas de soja aumentou significativamente a fluorescência inicial (F_o) assim como reduziram a fluorescência máxima (F_m) indicando assim uma diminuição da relação F_v/F_m , o que pode ser traduzido como uma redução da eficiência do fotossistema II (PSII) (NASON; FARRAR; BARTLETT, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo da Soja

Foram conduzidos dois experimentos simultâneos em mesmo local, porém com finalidades distintas, tendo um deles o objetivo de aquisição de dados referentes ao conteúdo de clorofila *a* e *b*, fluorescência da clorofila, trocas gasosas e carboxilação da rubisco através de medições com um analisador de gases por infravermelho (IRGA) acoplado a fluorômetro (item 3.4.1). O outro experimento teve como objetivo a coleta de folhas e dados para estudo da atividade das enzimas do sistema antioxidante (item 3.4.4). Essa divisão em dois experimentos foi estabelecida, pois, a coleta de folhas para análises bioquímicas é uma avaliação destrutiva, onde folhas são destacadas das plantas e armazenadas para futuras análises, podendo deste modo gerar uma perturbação e estresse nas plantas, o que poderia ocasionar alterações indesejadas durante a aquisição dos dados de medições de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas, caso todas as análises fossem realizadas dentro de um mesmo experimento e na mesma planta.

Ambos os experimentos foram conduzidos em vasos de 15 litros em casa de vegetação localizada no município de Holambra-SP, (22°38'56.4" latitude Sul, 47°04'53.2" de longitude Oeste e 640 m de altitude). Os vasos foram compostos por terra de barranco e areia na proporção 2:1 e adubados com uma a formulação 4-20-20 (NPK) a fim que se obtivesse uma quantidade proporcional à 300 kg ha⁻¹ desse adubo, incorporados durante o preparo do solo que compuseram a base de sustentação para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

A fim de evitar a interferência de déficit hídrico nos tratamentos, as plantas foram irrigadas duas vezes por dia, através de sistema de aspersão presente na estufa onde os ensaios foram conduzidos, garantindo assim a manutenção do solo na capacidade de campo.

As condições de temperatura e irradiância seguiram de acordo com o ambiente, sem controle, portanto, de fotoperíodo. Porém a temperatura foi monitorada durante o período de avaliação do ensaio (Figura 5).

Figura 5. Temperatura média, máxima e mínima durante o período de avaliação do experimento.

Observa-se que a temperatura se manteve em uma faixa ótima para o crescimento e desenvolvimento das plantas de soja (Figura 5), mantendo-se entre 20°C em um extremo de mínima temperatura e 35°C em alguns momentos como máximo de temperatura local.

Foi utilizada a variedade de soja NS 7901, que foi semeada através de semeadura manual no dia 18 de outubro de 2017 para ambos os ensaios. Inicialmente semeou-se 3 indivíduos por vasos, deixando apenas uma planta mais vigorosa após a emergência das mesmas.

Foi monitorada durante todo o período do ensaio a presença de pragas e doenças. Como os experimentos foram conduzidos em ambiente fechado de casa de vegetação, não se detectou em nenhum momento da condução destes, a presença de pragas ou doenças que pudessem interferir negativamente na avaliação, não havendo assim a necessidade de medidas de controle adicionais.

3.2. Delineamento experimental

Ambos os ensaios foram conduzidos em blocos casualizados (Figura 6 e Figura 7), de maneira simultânea, em mesmo local, com plantio e imposição dos tratamentos em momentos simultâneos, para que os dados gerados pudessem ser analisados de maneira conjunta. Porém, por apresentarem objetivos e métodos de aquisição de dados diferentes, o delineamento experimental adotado para cada um desses experimentos foi o que melhor se enquadrava às condições experimentais (Figura 7).

Figura 6. Disposição dos vasos em blocos casualizados

Figura 7. Representação esquemática dos experimentos.

3.2.1. Experimento I (Trocas gasosas e fluorescência)

Cada parcela foi representada por 1 vaso contendo 1 planta e o delineamento experimental foi o de blocos casualizados com medidas repetidas (Figura 6 e Figura 7), contendo seis repetições e três tratamentos: [1] controle (testemunha); [2] plantas que receberam aplicação de STL+AZT (+ adjuvante Nimbus); [3] plantas que receberam aplicação de PTZ+TFS (+ adjuvante Aureo). A aplicação dos fungicidas ocorreu em dois momentos: aos 42 dias após a emergência, quando as plantas se encontravam em início do florescimento (R1), como primeira aplicação e aos 15 dias após a primeira aplicação como segunda aplicação. Esses períodos foram selecionados pois, seguem as recomendações dos fabricantes dos produtos, e visam, quando em condições de campos comerciais, cobrir todas as folhas das plantas de soja, sendo R1 a última chance para se atingir as folhas do baixeiro.

Para aquisição dos dados para esse experimento o folíolo central das folhas da terceira posição de cima para baixo foram marcados com fitilho, a fim de se realizar todas as medições ao longo do experimento no mesmo trifólio e na mesma região central deste trifólio, caracterizando portanto um delineamento em medidas repetidas, com o intuito de se avaliar a comportamento fotossintético de cada tratamento com o mínimo de interferência possível.

3.2.2. Experimento II (Enzimas do sistema antioxidante)

Diferentemente do proposto para o experimento I (Trocas gasosas e fluorescência), cada parcela do experimento II (Enzimas do sistema antioxidante) foi representada por 4 vasos contendo 1 planta em cada vaso, o delineamento experimental adotado para este ensaio foi o de parcelas subdivididas (4 vasos) em blocos casualizados (Figura 6 e Figura 7) em medidas repetidas, contendo seis repetições e os mesmos três tratamentos já descritos no experimento I.

A escolha pelo delineamento em parcelas subdivididas e medidas repetidas no tempo se apresentou como a melhor forma para se adequar a metodologia de coleta e análises propostas. Quanto a coleta, sempre foi toda a folha da terceira posição de cima para baixo de cada planta. Coletou-se amostras para análises bioquímicas, aos 0, 1, 2 e 3 dias após cada aplicação, sendo que cada planta foi perturbada pela coleta das folhas apenas 1 vez após cada aplicação. Essa metodologia adotada permitiu que as alterações provocadas pelo destaque das folhas não interferissem de maneira direta na avaliação do conteúdo de enzimas do sistema antioxidantes.

3.3. Imposição dos tratamentos

As plantas de soja dos experimentos I e II foram cultivadas sem interferência externa até o dia 05 de dezembro de 2017, quando se completou 42 dias após a emergência das mesmas. Aos 42 dias após a emergência foram impostos os tratamentos de acordo com o fungicida a ser testado, sendo [1] controle (testemunha); [2] plantas que receberam aplicação de STL+AZT (+ adjuvante Nimbus); [3] plantas que receberam aplicação de PTZ+TFS (+ adjuvante Aureo) (

Tabela 2). Os fungicidas testados são hoje os principais fungicidas utilizados na sojicultura brasileira para controle da ferrugem asiática da soja, sendo que foram selecionados para o presente estudo pela sua importância no cenário agrícola brasileiro e abrangência de utilização pelos produtores de soja.

A imposição dos tratamentos se deu através da utilização de aplicador costal com pressurização por ar comprimido (Figura 8), regulado para uma aplicação total de calda de 200 L/ha, com pressurização de 2,5 bar. Os tratamentos foram aplicados sobre o dosel das plantas a um volume de 150 litros por hectare de calda, de forma a conseguir uma cobertura uniforme e boa distribuição de gotas.

As doses utilizadas para a imposição dos tratamentos foram as doses comerciais recomendadas pelas empresas fabricantes dos fungicidas, assim como utilizou-se a recomendação da utilização de adjuvantes de acordo com a recomendação dessas mesmas empresas (Tabela 2). A opção pela utilização da dose comercial, assim como de adjuvante recomendado teve por objetivo testar a dose real utilizada pelos produtores brasileiros e poder inferir sobre os efeitos fisiológicos provocados pelos fungicidas em uma utilização real.

Figura 8. Pulverizador costal com pressurização por ar comprimido

Tabela 2. Lista e época de imposição dos tratamentos.

TRATAMENTO	1. ^a APLICAÇÃO (42 DAE)	2. ^a APLICAÇÃO (15 DAA1)	DOSES APLICADAS
T ₁	Controle (Sem aplicação)	Controle (Sem aplicação)	-
T ₂	Carboxamida+Estrobilurina (STL+AZT)*	Carboxamida+Estrobilurina (STL+AZT)*	200 g p.c./ha 30 + 60 g i.a./ha
T ₃	Triazol+Estrobilurina (PTZ+TFS)**	Triazol+Estrobilurina (PTZ+TFS)**	400 ml p.c./ha 70+60 g i.a./ha

Adjuvantes adicionados conforme recomendação dos fabricantes. * Ninbus (600 ml/ha), ** Aureo (400 ml/ha). p.c. - produto comercial. i.a. - ingrediente ativo. DAE = dias após a emergência. DAA1 = dias após a aplicação 1.

Como pode ser verificado na Tabela 2 utilizou-se para o tratamento 2 a dose de 200 gramas do produto comercial por hectare, o que corresponde a um total de 30 gramas por hectare do ingrediente ativo benzovindiflupir (solatenol – STL) mais 60 gramas do ingrediente ativo azoxistrobina (AZT). Para este tratamento foi adicionado 600 mililitros por hectare do adjuvante Nimbus, conforme recomendação do fabricante. Para o tratamento 3 foi utilizada a dose de 400 mililitros por hectare do produto comercial, o que corresponde a um total de 70 gramas por hectare do ingrediente ativo protioconazol (PTZ), mais 60 gramas por hectare do ingrediente ativo trifloxistrobina (TFS). Para este tratamento foi adicionado à calda de aplicação o adjuvante Aureo a uma dosagem correspondente a 400 mililitros por hectare de produto comercial, conforme recomendação do fabricante.

No dia 20 de dezembro de 2017, aos 15 dias após a primeira aplicação, foi realizada uma segunda imposição dos tratamentos a essas mesmas plantas, seguindo o mesmo raciocínio já exposto aqui, com as mesmas doses e adjuvantes recomendados. Essa segunda aplicação foi realizada para garantir a recomendação de uso dos fungicidas pelos fabricantes, que é de duas aplicações com início em R1 (início do florescimento) ou no máximo até 45 dias após a emergência, com reaplicação dos mesmos produtos 15 dias após a primeira aplicação.

3.4. Avaliações

Para o experimento I foram realizadas avaliações do conteúdo de clorofila *a* e *b* com o auxílio do equipamento Clorofilog da marca Falker (Modelo: CFL1030) (item 3.4.1), assim como os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (item 3.4.2), trocas gasosas (item 3.4.3) e curva de resposta de assimilação de CO₂ (*A*) à concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) (item 3.4.4), curva *A/C_i*, com a utilização de um analisador de gases por infravermelho (IRGA), modelo LI 6400 XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA), acoplado a um fluorômetro.

Para o experimento II foram realizadas avaliações da atividade das enzimas do sistema antioxidante (item 3.4.5).

3.4.1. Conteúdo de clorofila *a* e *b*

A quantificação do conteúdo de clorofila *a* e *b* foi realizada aos 1, 2, 4, 5, 6, 11, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 dias após a primeira aplicação, sempre no folíolo central do terceiro trifólio totalmente expandido, de cima para baixo, com o auxílio do equipamento Clorofilog da marca Falker, modelo: CFL1030 (Figura 9), com área ativa de recepção de 9 mm² e área foliar de medição de 50,3 mm².

Segundo o fabricante do equipamento, a medição é feita de forma ótica, utilizando conhecimento científico de frequências de luz que a clorofila melhor processa na fotossíntese. O clorofiLOG utiliza 3 faixas de frequência de luz, permitindo uma análise detalhada, levando em consideração a presença de clorofila dos tipos *a* e *b*. Os resultados numéricos não possuem unidade específica, sendo que são medidas relativas e devem sempre ser tomadas comparativamente a outras medidas da mesma planta em dias diferentes ou comparativamente a outras plantas, segundo o fabricante a unidade de medida é referenciada por um índice de clorofila Falker (ICF).

Figura 9. Clorofilog Falker CFL1030

3.4.2. Fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com auxílio de um IRGA acoplado a um fluorômetro (6400-40 Leaf Chamber Fluorometer) (Figura 10), aos 0, 1, 2, 4, 11, 15, 16, 17, 18 e 22 dia após a primeira aplicação, sempre no folíolo central do terceiro trifólio totalmente expandido, de cima para baixo. As avaliações para plantas adaptadas ao escuro foram tomadas entre as 5:00 e 6:00 horas da manhã, em pré-amanhecer, para garantia de que os centros de reação do fotossistema II (PSII) estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários de elétrons oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de emissão da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (*F_o*) e fluorescência máxima (*F_m*). A partir desses valores foi calculado a eficiência quântica potencial do PSII (*F_v/F_m*) (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2003), cuja fórmula se encontra na Tabela 1.

Figura 10. Analisador de gases por infravermelho (IRGA)

As variáveis para plantas adaptadas ao claro foram tomadas entre 9:00 e 13:30 horas, também com o IRGA acoplado a um fluorômetro (Figura 10) nos mesmos dias que foram tomadas as avaliações para plantas adaptadas ao escuro. Em um primeiro momento, os folíolos avaliados foram adaptados à luz, pela iluminação com $1000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) imposta pela luz actínica do equipamento. Foi aguardada a estabilização da fluorescência e da assimilação de CO_2 , observadas no coeficiente de variação (CV) do próprio aparelho.

Em seguida aplicou-se sequencialmente, através do IRGA, um flash saturante do tipo retângular de luz actínica (aproximadamente $7.000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e um pulso de luz na faixa do vermelho distante, para a determinação das variáveis: fluorescência inicial para plantas adaptadas à luz (F_o'), fluorescência máxima para plantas adaptadas à luz (F_m') e fluorescência no estado estacionário (F_s).

Através dessas informações foi possível calcular a eficiência quântica máxima de conversão fotoquímica de energia no PSII (F_v'/F_m') (GENTRY; BRIANTAIS; BAKER, 1989), cuja fórmula se encontra na Tabela 1. A rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (BILGER; SCHREIBER; BOCK, 1995), o valor de 0,5 utilizado na fórmula para o cálculo de ETR corresponde à fração de energia de excitação distribuída para o PSII e PSI (LAISK; LORETO, 1996). O *quenching* não fotoquímico (NPQ) foi calculado de acordo com (BILGER; BJORKMAN, 1990) e consta na Tabela 1.

Ainda através dos dados obtidos tanto para plantas adaptadas ao escuro, como para plantas adaptadas à luz, foi possível calcular outros importantes parâmetros fotossintéticos, tais como rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), proporção de centros de reações do PSII “abertos” (qP) e dissipação de energia não radiativa em calor (qN), conforme fórmulas apresentadas na Tabela 1.

3.4.3. Trocas Gasosas

Nos mesmos momentos em que foram tomadas as medidas para a fluorescência da clorofila *a* em plantas adaptadas à luz, aos 0, 1, 2, 4, 11, 15, 16, 17, 18 e 22 dias após a primeira aplicação, também com o auxílio do IRGA (Figura 10), foram tomados os seguintes parâmetros de trocas gasosas: taxa de assimilação de carbono [A , $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], taxa transpiratória [E , $\text{mmol}(\text{H}_2\text{O}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], condutância estomática [g_s , $\text{mol}(\text{H}_2\text{O}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], concentração intercelular de CO_2 [C_i , $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{ mol}^{-1}$], além da temperatura foliar [T_f , $^{\circ}\text{C}$]. Esses parâmetros foram tomados sempre no folíolo central do terceiro trifólio totalmente expandido, de cima para baixo, sendo que o folíolo de medição foi identificado através de uma marcação com fitilho, afim de que se tomassem medidas repetidas ao longo de todo o período de avaliação do experimento, sempre no mesmo folíolo e tentando-se manter as medições sempre na mesma porção central deste folíolo.

3.4.4. Resposta fotossintética à concentração intercelular de CO_2

Para a determinação da eficiência carboxilativa da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) foram realizadas curvas de resposta de assimilação de CO_2 em função da disponibilidade intercelular de CO_2 (C_i), curvas A/C_i . Este dados foram tomados com o auxílio do IRGA (Figura 10), aos 5 e 19 dias após a primeira aplicação, o que corresponde aos 5 dias após a primeira aplicação e 4 dias após a segunda aplicação. A curva A/C_i foi realizada utilizando-se, na sequência em que são apresentados, os valores de CO_2 submetidos à folha por meio de cilindro

externo: 380, 300, 200, 100, 50, 380, 380, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para cada uma das parcelas do experimento e dias analisados, conforme proposto por SHARKEY et al. (2007).

Durante a imposição da curva de disponibilidade de CO_2 , foram tomadas as medidas dos pares da taxa de assimilação de CO_2 (A) e da concentração intercelular de CO_2 (C_i), com o objetivo de se estabelecer uma curva de resposta fotossintética (A) pela disponibilidade intercelular de CO_2 . Através dos dados coletados e seguindo o proposto por SHARKEY et al. (2007) foi possível estabelecer alguns importantes parâmetros relacionados com a fisiologia das folhas de soja com e sem a aplicação dos tratamentos.

Através dessa metodologia foi possível estabelecer os parâmetros: taxa máxima de carboxilação permitida pela rubisco (V_{cmax}); taxa de transporte de elétrons (baseado no requerimento de NADPH) (J); uso de triose-fosfato (TPU); respiração diurna (R_d) e condutância mesofílica para o CO_2 (g_m) (SHARKEY et al., 2007).

3.4.5. Enzimas antioxidantes

3.4.5.1. Extração enzimática

A extração enzimática foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por AZEVEDO et al. (1998). O material coletado, aproximadamente 1 g de tecido foliar, foi macerado com nitrogênio líquido contendo 3 mL de polivinilpirrolidona (PVPP, 4%). O extrato enzimático foi centrifugado a 13.000 g ($\equiv$ 10.000 RPM) durante 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas (200 μL), para posterior utilização como extrato bruto das análises enzimáticas.

3.4.5.2. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi conduzida de acordo com ALEXIEVA et al. (2001). Amostras de tecido foliar fresco (0,2 g) foram homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1% e PVPP (20%), seguido da centrifugação a 13000 g por 10 min a 4°C. A reação foi iniciada após adição de 0,2 mL do sobrenadante ao meio de reação contendo 0,2 mL do tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) e 0,8 mL de 1M KI (w/v). As amostras foram feitas em triplicatas e mantidas no escuro por 1 h e, após esse período, mediu a absorbância a 390 nm. Para certificação de que não houve resíduo de outros materiais, estabeleceu-se uma amostra denominada como “branco”. Para tal utilizou-se 0,2 mL de TCA 0,1% no lugar do sobrenadante. A quantidade de peróxido de hidrogênio foi mensurada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de H_2O_2 .

3.4.5.3. Determinação de malondialdeído (MDA)

O nível de peroxidação lipídica foi medido pela estimativa de MDA, um produto da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados peroxidados do lipídio da membrana seguindo o método de HEATH; PACKER (1968). As amostras de 0,2 g de material vegetal foram homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA - 0,1%), contendo aproximadamente 20% de PVPP e centrifugadas a 13000 g ($\equiv$ 10.000 RPM) por 10 minutos a 4 °C. O

sobrenadante (0,250 mL) foi misturado com 1 mL de TCA (20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico TBA). A mistura reacional foi aquecida a 95°C durante 20 min em banho-maria e depois arrefecida rapidamente num banho de gelo e posteriormente deixou-se em bancada e protegido da luz, por 15 minutos, para atingir temperatura ambiente. A absorbância do sobrenadante colorido foi monitorada a 532 e 440 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração do complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) produzido foi calculado, utilizando o coeficiente de extinção molar 155 mM⁻¹.

Os dados de MDA foram expressos em nmol de MDA g⁻¹ MF.

3.4.5.4. Proteínas solúveis totais

A concentração de proteína foi feita utilizando-se o Kit da Bio-Rad, segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e soro albumina bovina (BSA) como padrão. Os valores foram determinados utilizando-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de BSA (bovine serum albumine) através de regressão linear.

3.4.5.5. Peroxidase do ascorbato (APX)

Para a atividade da APX foi utilizada a metodologia proposta por MOLDES et al. (2008). A reação foi iniciada após adição de 50 µL do extrato enzimático bruto na solução de reação contendo 650 µL de tampão fosfato de potássio, 100 µL de ascorbato, 100 µL EDTA e 100 µL H₂O₂. A atividade da APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm durante um minuto a 30°C em um espectrofotômetro UV-VIS. O coeficiente de extinção molar 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO; ASADA, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX e os valores expressos em nmol.min⁻¹mg⁻¹ de proteína.

3.4.5.6. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pela velocidade da quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 240 nm em espectrofotômetro durante um minuto a 25°C (KRAUS; MCKERSIE; FLETCHER, 1995), com algumas modificações conforme AZEVEDO et al. (1998). A reação foi iniciada após adição de 25 µL do extrato bruto enzimático em 990 µL do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0) e H₂O₂ (2,5 mM). O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) foi utilizado para calcular a atividade da enzima, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.4.5.7. Glutathiona redutase (GR)

Para a atividade de GR foi utilizado a metodologia descrita por GOMES-JUNIOR et al. (2006), com algumas modificações. A reação foi iniciada após adição de 50 µL do extrato bruto enzimático e adicionado em um mL da mistura reacional contendo tampão fosfato de potássio com DTNB, GSSG e NADPH. A diminuição da absorbância foi determinada a 420 nm em espectrofotômetro UV-VIS por um minuto a 30°C. O coeficiente de

extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade de GR, que foi expressa como $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (FOYER; HALLIWELL, 1976).

3.4.5.8. Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) e (CEMBROWSKA-LECH; KOPROWSKI; KĘPCZYŃSKI, 2015). A reação foi iniciada após adição do extrato enzimático bruto na mistura reacional contendo tampão fosfato de potássio, metionina, NBT, EDTA e riboflavina, totalizando 1,5 mL de meio de reação. A reação ocorreu a 25°C em uma câmara de reação sob exposição de uma lâmpada de 15 W. Após cinco minutos de exposição à luz, a mesma foi interrompida e a produção de formazana azul, resultado da fotoredução do NBT, foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro. As amostras controle foram mantidas no escuro durante cinco minutos e medida a absorbância a 560 nm. Os valores obtidos do branco das amostras foram subtraídos dos valores das amostras de cada uma das repetições de cada tratamento exposto à luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

3.5. Análise Estatística

Ambos os experimentos foram submetidos à análise da variância a 5% de significância considerando-se um delineamento em parcelas subdivididas no tempo (NOGUEIRA, 2007), com as seis repetições em blocos casualizados. A comparação das médias entre os tratamentos foi submetida ao teste de Tukey a 5%.

Para a análise da relação entre os parâmetros fotossintéticos NPQ (variável independente) e Φ_{PSII} (variável resposta) foi feita a análise de regressão polinomial múltipla de grau 3, com aplicação do teste *f* a 5% de significância, considerando como fatores os tratamentos, interação tratamentos e NPQ e efeito de NPQ linear, quadrático e cúbico (NOGUEIRA, 2007).

Para a análise da relação entre os parâmetros fotossintéticos A (variável independente) e ETR (variável resposta) foi feita a análise de regressão polinomial múltipla de grau 3, com aplicação do teste *f* a 5% de significância, considerando como fatores os tratamentos, interação tratamentos e ETR e efeito de ETR linear, quadrático e cúbico (NOGUEIRA, 2007).

Quando necessária a transformação de dados para homogeneização da variância ou normalização dos resíduos, utilizou-se o método de Box&Cox (BOX; COX, 1982).

O pacote estatístico utilizado para as análises foi o JMP/SAS versão 12.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I (Trocas gasosas e fluorescência)

4.1.1. Conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b*

As leituras de clorofila não demonstraram alteração significativa no conteúdo total de clorofila *a* (Apêndice A - Tabela 4), quando os tratamentos com SLT+AZT e PTZ+TFS foram impostos às plantas de soja (Figura 11A e B), porém PTZ+TFS promoveu uma redução significativa do conteúdo de clorofila *b* (Figura 11C e D) (Apêndice A - Tabela 5).

Essa redução no conteúdo de clorofila *b*, observado após a imposição do tratamento com o fungicida PTZ+TFS foi significativa durante toda a condução do experimento (Apêndice A -Tabela 5), sendo que não se observou interação entre produtos (tratamentos) e os dias analisados. Isso nos permite concluir que a redução no conteúdo de clorofila *b*, foi ocasionada pela imposição do tratamento, em outras palavras, a redução no conteúdo total de clorofila *b* foi ocasionada pela aplicação do fungicida PTZ+TFS, sendo que essa redução se manteve ao longo de todo o período analisado até 4 dias após a segunda aplicação.

4.1.2. Fluorescência da clorofila *a*

Partindo da premissa que a energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos pode seguir três caminhos distintos, e que competem entre si pela energia, sendo eles: dissipação fotoquímica, dissipação em forma de calor (dissipação não fotoquímica) (NPQ) e dissipação na forma de re-emissão de energia luminosa (fluorescência) (MULLER, 2001), foram tomadas medidas dos principais parâmetro de fluorescência para mensurar se a aplicação dos fungicidas SLT+AZT e PTZ+TFS alterou a cinética de dissipação energética e consequentemente o funcionamento do aparato fotossintético.

Essas medidas foram tomadas tanto para as plantas adaptadas ao escuro: fluorescência inicial (F_o) e fluorescência máxima (F_m), como para as plantas adaptadas ao claro: fluorescência inicial (F_o'), fluorescência máxima (F_m') e fluorescência no estado de estacionário (F_s).

A Figura 12, adaptada de KALAJI; GUO (2008), apresenta de forma simplificada o esquema de coleta dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, assim como algumas das formulas utilizadas para o cálculo dos possíveis caminhos de dissipação da energia absorvida pelas plantas de soja.

Figura 12. Fluorescência da clorofila *a* para plantas adaptadas ao escuro e ao claro. Indicação das possíveis rotas de dissipação da energia absorvida. Adaptado de (KALAJI; GUO, 2008). ML (Luz de medida), SP (Pulso de luz saturante). AL (Luz Actínica), FR (Pulso de luz vermelho distante).

Podemos observar que os parâmetros F_v/F_m e F_v'/F_m' (Figura 12) nos fornecem informações sobre a “saúde” no aparato fotossintético, em outras palavras, nos fornecem informações sobre a eficiência na absorção de

energia fotossinteticamente ativa pelos pigmentos antena, enquanto que os possíveis caminhos de dissipação dessa energia absorvida nos fornece informações sobre a capacidade da planta em utilizar essa energia para o processo fotossintético.

4.1.2.1. Atributos relacionados à saúde do aparato fotossintético (F_o , F_m , F_v/F_m e F_o' , F_m' , F_v'/F_m')

Apesar de pequenas alterações serem observadas no decorrer do ensaio após a imposição dos tratamentos, a aplicação dos fungicidas não alterou significativamente os parâmetros para plantas adaptadas ao escuro, F_o (Figura 13A, Apêndice A - Tabela 6), F_m (Figura 13C, Apêndice A -Tabela 7) e F_v/F_m (Figura 13E, Apêndice A -Tabela 8) para nenhum dos dias analisados. Alterações nestes parâmetros poderiam indicar dano no aparato fotossintético, uma vez que plantas adaptadas ao escuro estão com quase a totalidade dos aceptores primários de elétrons (e^-) ditos como “abertos”, ou seja, se encontram em um estado de re-oxidação e aptos a receberem e^- provenientes do centro de reação do PSII (D1). Um aumento em F_o poderia indicar que a imposição dos tratamentos alterou a configuração entre os complexos coletores de luz (LHCII) e o centro de reação do fotossistema II (PSII), essa alteração de configuração, ou aumento entre o espaço físico entre eles, mesmo que de poucos Ångströms (Å), poderia ocasionar um aumento em F_o , uma vez que LHCII estaria com uma capacidade limitada em re-transmitir a energia absorvida para centro de reação do PSII (BJORKMAN; DEMMIG, 1987).

Outrossim, uma redução em F_m poderia significar uma redução no conteúdo total de clorofila ou pigmentos no LHCII, fazendo com que a capacidade de absorção de energia luminosa pela planta fosse reduzida e consequentemente levando a uma redução da eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m).

Observou-se que a aplicação do fungicida PTZ+TFS reduziu o F_v/F_m sempre no primeiro dia após cada uma das aplicações (Figura 13E), porém essa redução não apresentou significância estatística (Apêndice A - Tabela 8) dentro do conjunto de dados coletados.

Ainda neste contexto, a redução observada em F_v/F_m nas plantas que receberam tratamento com o fungicida PTZ+TFS alterou esse parâmetro de 0,82 para 0,81 quando se compara antes e no primeiro dia após a aplicação (respectivamente) para a primeira aplicação e de 0,81 para 0,80 para a segunda aplicação o que não configura dano no aparato fotossintético, sendo que um índice entre 0,75 e 0,85 ainda representam plantas com aparato fotossintético saudável (BJORKMAN; DEMMIG, 1987)

Assim como ocorreu para os parâmetros fotossintéticos para plantas adaptadas ao escuro, a imposição do tratamentos não alterou de maneira geral e de forma significativa os parâmetros analisados para plantas adaptadas ao claro, fluorescência inicial (F_o') (Figura 13B, Apêndice A - Tabela 9), fluorescência máxima (F_m') (Figura 13D, Apêndice A -Tabela 10) e o rendimento quântico máximo do PSII (F_v'/F_m') (Figura 13F, Apêndice A - Tabela 11) .

Porém, diferente do observado para plantas adaptadas ao escuro a alteração ocorrida em F_m' no primeiro dia após a imposição dos tratamentos se apresentou de maneira mais marcante para o tratamento com o fungicida PTZ+TFS sofrendo uma redução significativa dentro do conjunto de dados analisados (Apêndice B - Figura 32, Apêndice A - Tabela 11). A imposição desse tratamento reduziu esse parâmetro de forma significativa de 1175,5 para 998,2 elétrons quantum⁻¹ enquanto que a aplicação com o fungicida STL+AZT variou nas mesmas proporções observadas para o tratamento controle (sem aplicação de fungicidas) (Figura 13D).

Figura 13. Parâmetros fotoquímicos da fluorescência da clorofila *a*. (A) Fluorescência inicial para plantas adaptadas ao escuro (F_0). (B) Fluorescência inicial para plantas adaptadas ao claro (F_0'). (C) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao escuro (F_m). (D) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro (F_m'). (E) Eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m). (F) Eficiência quântica máxima do PSII (F_v'/F_m'). (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).

Em decorrência da alteração observada em F_m' um dia após a primeira aplicação de PTZ+TFS, observou-se também uma redução no rendimento quântico máximo do PSII (F_v'/F_m') (Figura 13F) nas plantas tratadas com esse fungicida, de 0,59 para 0,55. Essa redução apesar de se apresentar de maneira significativa (Apêndice A - Tabela 11), ainda manteve o índice dentro de um nível esperado para plantas com o aparato fotossintético saudável (BJORKMAN; DEMMIG, 1987).

Apesar das alterações causadas pela aplicação do fungicida PTZ+TFS um dia após a imposição dos tratamentos, a análise dos resultados sobre os parâmetros fotossintéticos, tanto para plantas adaptadas ao escuro (Figura 13A, C e E) quanto para plantas adaptadas ao claro (Figura 13B, D e F) nos fornecem informações necessárias para concluir que nenhum dos fungicidas testados, interferiu de maneira significativa no status de integridade do aparato fotossintético, sendo que ambos os fungicidas foram capazes de preservar a capacidade de absorção de energia luminosa em plantas de soja.

4.1.2.2. Caminhos de dissipação da energia luminosa (Φ_{PSII} e NPQ, qP e qN)

Apesar de alterações significativas na capacidade de absorver energia luminosa não terem sido observadas para nenhum dos fungicidas testados, o balanço entre os três caminhos de dissipação dessa energia foi alterado em função de um ou outro fungicida.

Para as plantas de soja que receberam aplicação do fungicida STL+AZT não foram observadas alterações no NPQ (Figura 14A) de forma significativa (Apêndice A - Tabela 13) para todos os dias analisados, quando comparado com o tratamento controle. Constatou-se, entretanto, que a aplicação desse fungicida, mesmo que de forma não significativa, reduziu a dissipação não fotoquímica (NPQ) de maneira permanente durante todo o período de condução do experimento, sendo que uma diferença significativa nessa forma de dissipação foi observada apenas um dia após a imposição dos tratamentos, se destacando tanto quando comparado com o tratamento controle, mas principalmente, quando comparado com o fungicida PTZ+TFS (Figura 14A) onde uma diferença significativa pelo teste de Tukey (5%) foi observada (Apêndice A - Tabela 13).

Apesar de não ter um efeito significativo ao longo dos dias (Apêndice A - Tabela 13) a aplicação de PTZ+TFS aumentou significativamente a dissipação não fotoquímica (NPQ) um dia após a primeira aplicação (Figura 14A, Apêndice A - Tabela 13), variando de maneira muito similar, para os outros dias analisados, quando comparado ao tratamento controle.

A constatação de que a imposição dos tratamentos não alterou de forma significativa NPQ corrobora com o já observado anteriormente para os parâmetros fotossintéticos F_m (Figura 13C) e F_m' (Figura 13D), uma vez que NPQ é uma medida que leva em conta a diferença entre esses dois fatores ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$). Outrossim, a elevação de NPQ em função da aplicação do fungicida PTZ+TFS um dia após a primeira aplicação (Figura 14A) vai ao encontro da alteração observada em F_m' (Figura 13D) um dia após a aplicação deste mesmo fungicida.

De maneira geral observou-se que a imposição dos tratamentos não alterou significativamente NPQ (Figura 14B, Apêndice A - Tabela 13) durante a condução do experimento, nos levando a crer que apesar das pequenas alterações provocadas pela aplicação do fungicida PTZ+TFS, e de maneira mais marcante um dia após cada aplicação, a aplicação dos fungicidas testados não altera a dissipação não fotoquímica (NPQ), alterando, porém os outros caminhos de dissipação energética.

A aplicação de STL+AZT aumentou de forma significativa (Apêndice A - Tabela 12) a dissipação fotoquímica, medida referenciada pelo rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) ao longo de todo o período de

condução do experimento (Figura 14C). Esse aumento em Φ_{PSII} se dá de maneira significativa pelo teste de Tukey (5%) quando comparado com o tratamento onde foi aplicado o fungicida PTZ+TFS (Apêndice A - Tabela 12), a partir do primeiro dia após a imposição dos tratamentos até o último dia de medições (Figura 14C). Quando comparado com o tratamento controle observa-se um descolamento das curvas de Φ_{PSII} , entretanto não há uma significância estatística entre estes dois tratamentos.

Figura 14. Caminhos de dissipação da energia luminosa. (A) Dissipação não fotoquímica (NPQ) ao longo dos dias. (B) Média de dissipação não fotoquímica para os dias analisados. (C) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) ao longo dos dias. (D) Média do rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Assim como observado para outros parâmetros a aplicação do fungicida PTZ+TFS apresentou redução mais marcante em Φ_{PSII} para o primeiro dia após cada aplicação, porém diferente do observado anteriormente essa redução em Φ_{PSII} provocada pela aplicação de PTZ+TFS ocorre de maneira permanente ao longo de todo o período de condução do experimento. A análise estatística para Φ_{PSII} nos revela que não há interação entre o comportamento dos tratamentos e os dias analisados (Apêndice A - Tabela 12), o que nos permite apresentar a média dos valores obtidos para esse parâmetro entre os dias (Figura 14D) e concluir que a dissipação, ou em outras palavras, a utilização

da energia luminosa absorvida pelas plantas de soja sob o tratamento do fungicida STL+AZT é superior aos das plantas de soja sob tratamento com o fungicida PTZ+TFS (Figura 14D).

Outrossim, observa-se que a aplicação de STL+AZT aumenta, mesmo que de maneira não significativa, a eficiência na utilização da energia absorvida (Φ_{PSII}) quando comparado com o tratamento controle. Da mesma forma podemos inferir que a aplicação do fungicida PTZ+TFS reduz, também de maneira não significativa, a dissipação fotoquímica Φ_{PSII} quando comparado com as plantas do tratamento controle. Fica evidente, no entanto, a superioridade no rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) para o fungicida STL+AZT, quando comparado ao fungicida PTZ+TFS (Figura 14D).

Como era de se esperar, a proporção de centros de reação do PSII “abertos” (qP) e a dissipação de energia não radiante em forma de calor (qN) segue a mesma dinâmica encontrada para os parâmetros Φ_{PSII} e NPQ respectivamente, uma vez que esses parâmetros levam em conta a mesma porção da faixa de fluorescência analisada (Tabela 3 e Figura 12, Apêndice A - Tabela 14 e Tabela 15).

Assim como o resultado obtido para NPQ, a aplicação de STL+AZT não alterou de forma significativa a dissipação de energia não radiativa em calor (qN) (Apêndice A - Tabela 15) para nenhum dos dias analisados, quando se compara às plantas do tratamento controle (Figura 15A).

Tabela 3. Equações comparativas entre Φ_{PSII} com qP e NPQ com qN

SÍMBOLO	PARÂMETRO FOTOQUÍMICO	FÓRMULA
Φ_{PSII}	Rendimento quântico efetivo do PSII	$(F_m' - F_s)/F_m'$
qP	Proporção de centros de reação do PSII “aberto”	$(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$
NPQ	Dissipação não fotoquímica (calor)	$(F_m - F_m')/F_m'$
qN	Dissipação de energia não radiativa em calor	$(F_m - F_m')/(F_m - F_o')$

Uma análise do conjunto de dados nos revela que a aplicação do fungicida PTZ+TFS alterou de maneira significativa a dissipação de energia não radiante em calor (qN) um dia após a primeira aplicação (Figura 15A, Apêndice A - Tabela 15), porém esse aumento, assim como encontrado para NPQ, não se fez de maneira permanente ao longo do período de condução do experimento (Figura 15A). Apesar do efeito provocado pela aplicação do fungicida PTZ+TFS um dia após a primeira aplicação, de maneira geral o comportamento de qN para ambos os fungicidas varia na mesma proporção encontrada para as plantas controle (Figura 15A e B), nos levando a conclusão que apesar de em um primeiro momento as alterações provocadas pelo fungicida PTZ+TFS para as plantas de soja, essas alterações não se expressam em qN por longos períodos, ficando restrito a um dia após a primeira aplicação.

Assim como constatado para a dissipação de energia por Φ_{PSII} , quando se analisa a proporção de centros de reação do PSII “abertos” (qP) verifica-se que a aplicação do fungicida STL+AZT alterou qP favorecendo a uma maior eficiência na utilização da energia luminosa absorvida (Apêndice A - Tabela 14). Apesar de não significativa pelo teste de Tukey (5%) quando se compara às plantas de soja sob efeito do fungicida STL+AZT com às plantas do tratamento controle, observa-se que qP se mantém numericamente superior durante todo o período de condução do experimento (Figura 15C).

Em contrapartida, constatou-se que a aplicação do fungicida PTZ+TFS alterou qP desfavorecendo a eficiência na utilização da energia luminosa (Figura 15C, Apêndice A - Tabela 14). Observa-se que a utilização deste fungicida reduziu qP, também de maneira não significativa pelo teste de Tukey (5%), comparando ao controle (Figura 15C), evidenciando-se claramente nesta figura três diferentes níveis para esse parâmetro, sendo que a utilização do

fungicida STL+AZT tende a um aumento em qP e a utilização do fungicida PTZ+TFS tende a uma redução nesse parâmetro.

Ainda pela análise estatística do conjunto de dados (Apêndice A - Tabela 14), constata-se que o comportamento dos tratamentos não tem interação com os dias analisados, ou seja, o comportamento de qP independe do dia em que foi analisado, nos permitindo apresentar os dados das médias para esse parâmetro entre os dias de condução do experimento (Figura 15D). Fica evidente, portanto, que existe um aumento significativo em qP nas plantas sob efeito de STL+AZT quando comparadas com as plantas tratadas com PTZ+TFS.

Figura 15. Proporção de centros de reação do PSII “abertos” (qP) e dissipação de energia não radiante em forma de calor (qN). (A) Proporção de PSII “fechado” (qN) ao longo dos dias. (B) Média da proporção de PSII “fechado” (qN) para os dias analisados. (C) Proporção de PSII “aberto” (qP) ao longo dos dias. (D) Média da proporção de PSII “aberto” (qP) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

4.1.3. Trocas gasosas e temperatura foliar

Até o presente momento das análises dos dados, constata-se que a aplicação dos fungicidas não afetou de forma significativa a integridade do aparato fotossintético e a capacidade de absorver energia luminosa pelas plantas de soja (Figura 13). Porém, a utilização dessa energia absorvida é fortemente afetada por ambos os fungicidas testados, sendo que a utilização de STL+AZT tende a um aumento para o caminho de dissipação fotoquímico enquanto a utilização do fungicida PTZ+TFS tende a uma redução nessa forma de dissipação (Φ_{PSII} - Figura 14D e qP - Figura 15D).

Aliado a estes importantes parâmetros analisados, outros fatores devem ser incorporados a uma análise conjunta, para um completo entendimento da interação entre os fungicidas e às plantas de soja. Dentro desse contexto análises da condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração intercelular do CO_2 (C_i), se fazem de extrema importância.

Constatou-se que a aplicação de STL+AZT não interferiu de forma significativa em g_s das plantas de soja (Apêndice A - Tabela 16), quando comparado com as plantas do tratamento controle (Figura 16A) para nenhum dos dias analisados. Assim como outros parâmetros já analisados, o comportamento de g_s se mantém ao longo de todo o período de condução do experimento, sendo que não há interação entre este comportamento e os dias em questão, nos permitindo uma análise mais ampla do efeito provocado sobre as plantas em resposta à utilização dos fungicidas testados.

Pode-se, desta maneira, analisar a média de g_s entre os dias analisados e concluir que a utilização de STL+AZT não afeta de maneira significativa g_s quando comparado com as plantas do tratamento controle (Figura 16B, Apêndice A - Tabela 16). Outrossim, seguindo o mesmo racional, verifica-se que a utilização do fungicida PTZ+TFS reduz g_s de maneira significativa ao longo de todo o período de condução do experimento (Figura 16A e B, Apêndice A - Tabela 16). Essa redução em g_s se fez de maneira mais expressiva um dia após a primeira aplicação, porém esse efeito, além de se fazer de forma permanente durante todo o período de condução do experimento, se fez também de maneira significativa quando se compara, tanto as plantas do tratamento controle, quanto as plantas tratadas com o fungicida STL+TFS.

Constata-se, portanto, que a utilização do fungicida PTZ+TFS reduziu g_s de maneira permanente durante todo o período de condução do experimento. Em contrapartida as plantas sob efeito do fungicida STL+AZT não sofreram alteração em g_s , tendo um comportamento similar ao observado para as plantas do tratamento controle. Assim como já observado para outros parâmetros, a aplicação do fungicida PTZ+TFS causou, possivelmente, um estresse maior nas plantas sob efeito deste fungicida, alterando de forma mais marcante, não apenas um, mas diversos fatores relacionados aos mecanismos fotoquímicos.

A condutância estomática nos dá informações sobre abertura da fenda estomática e consequentemente sobre o potencial de troca de gases entre o interior e o exterior da folha. Em outras palavras, para altos valores de g_s espera-se que haja também uma maior troca de vapores de água (H_2O) entre a câmara sub-estomática e o ambiente externo, do mesmo modo, espera-se, nessa condição, que haja um maior influxo de CO_2 do ambiente externo para os espaços intercelulares.

Figura 16. Parâmetros de trocas gasosas. (A) Condutância estomática (g_s) ao longo dos dias. (B) Média da condutância estomática (g_s) para os dias analisados. (C) Transpiração foliar (E) ao longo dos dias. (D) Média da transpiração foliar (E) para os dias analisados. (E) Concentração intercelular de CO_2 (C_i) ao longo dos dias. (F) Média da concentração intercelular de CO_2 (C_i) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Assim como constatado para g_s , e seguindo o mesmo padrão de comportamento, a aplicação do fungicida STL+AZT não apresentou alteração significativa na taxa de transpiração (E), quando se compara as plantas sob efeito desse fungicida com as plantas do tratamento controle (sem aplicação de fungicidas) (Figura 16D, Apêndice A - Tabela 17) para nenhum dos dias analisados.

Quanto a E das plantas de soja sob efeito de PTZ+TFS, constata-se que esse fungicida diminui significativamente essa variável para todos os dias analisados (Figura 16C e D, Apêndice A - Tabela 17).

A aplicação do fungicida PTZ+TFS reduz significativamente tanto g_s , quanto E , sendo que a influência do fungicida nesses parâmetros ocorre de maneira significativa e permanente durante todo o período de condução do ensaio.

Por se tratar de trocas gasosas que ocorrem prioritariamente pela fenda estomática, assim como ocorre com E , C_i é outro parâmetro que pode sofrer forte influência quando uma alteração em g_s é detectada. Entretanto nenhum dos fungicidas testados apresentou alteração significativa para esse parâmetro em nenhum dos dias analisados (Figura 16E, Apêndice A - Tabela 18).

Assim como para diversos parâmetros já apresentados, também para a concentração intercelular de CO_2 não há interação entre o comportamento dos tratamentos e os dias analisados (Apêndice A - Tabela 18), nos permitindo uma análise mais ampla dos efeitos da utilização desses fungicidas sobre a fisiologia das plantas de soja. Observa-se que nenhum dos fungicidas causou alteração em C_i (Figura 16F) quando comparados com o tratamento controle, independente do dia analisado.

Figura 17. Temperatura foliar (T_f , °C). (A) Temperatura foliar (T_f) ao longo dos dias. (B) Média da temperatura foliar (T_f) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Outro fator intimamente correlacionado com a transpiração é a temperatura foliar (T_f), uma vez que ao realizar a transpiração as plantas são capazes de liberar para o ambiente externo aquelas moléculas de água com maior energia e consequentemente que causam uma maior agitação do sistema como um todo. Em outras palavras, ao transpirar e liberar moléculas de água com energia mais alta, as plantas são capazes de resfriar a lâmina foliar, mantendo uma temperatura média mais amena dessa estrutura.

Neste contexto, foi constatado que a utilização do fungicida PTZ+TFS aumentou de forma significativa a temperatura foliar (T_f) das plantas tratadas com esse fungicidas, quando comparados, tanto com as plantas controle,

como quando comparado com as plantas sob efeito do fungicida STL+AZT (Figura 17A e B, Apêndice A - Tabela 19).

Apesar da alteração de poucos graus na temperatura foliar, a análise dos dados nos permite evidenciar que o aumento de T_f em decorrência da utilização do fungicida PTZ+TFS, ocorre de maneira significativa pelo teste de Tukey (5%) (Apêndice A - Tabela 17) e permanente durante todo o período de avaliações, diferindo estatisticamente da temperatura foliar observada nas plantas controle, assim como da temperatura foliar observado para as plantas tratadas com STL+AZT (Figura 17B).

4.1.4. Taxa de transporte de elétrons (ETR), assimilação de CO_2 (A)

Outro importante parâmetro, que aliado ao rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) estabelece a taxa de assimilação de CO_2 (A), é a taxa de transporte de elétrons (ETR) através dos fotossistemas até seu aceptor final (NADP^+). Essa taxa e consequente formação de NADPH, nos fornece informações sobre a eficiência na formação de fatores essenciais para que o ciclo de Calvin-Benson ocorra.

Constatou-se que a aplicação do fungicida STL+AZT promoveu um aumento relativo na ETR, assim como já constatado para Φ_{PSII} , quando comparado com as plantas do tratamento controle. Ainda nessa comparação constata-se que esse aumento de ETR não se dá de forma significativa quando comparado com as plantas controle (Apêndice A - Tabela 20), porém observa-se uma nítida separação para esse parâmetro ao analisar as curvas dos diferentes tratamentos durante o período de avaliações (Figura 18A).

Figura 18. Taxa de transporte de elétrons (ETR). (A) Taxa de transporte de elétrons (ETR) ao longo dos dias. (B) Média da taxa de transporte de elétrons (ETR) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. (*) diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Ao analisar o efeito do fungicida PTZ+TFS sobre a soja, pode-se constatar que o efeito que esse fungicida causa as plantas, e já evidenciado aqui através de outros parâmetros analisados, afeta diretamente a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 18A). Ainda que não seja detectada diferença significativa entre o ETR das plantas tratadas com PTZ+TFS quando comparado com as plantas controle, pode-se observar que esse fungicida reduz de maneira

permanente esse parâmetro durante todo o período de condução do experimento (Figura 18A, Apêndice A - Tabela 20).

Ao se realizar essa mesma comparação, porém entre as plantas sob influência dos diferentes fungicidas, fica claro o efeito deletério causado pela aplicação de PTZ+TFS quando se compara esse parâmetro com as plantas sob efeito do fungicida STL+AZT (Figura 18A). Por não haver interação entre o comportamento de ETR, influenciado pela aplicação dos fungicidas, com os dias analisados (Apêndice A - Tabela 20), permite-se que se faça uma análise conjunta dos dados avaliando as médias desse parâmetro entre os diferentes tratamentos. Consta-se, portanto, que existe diferença significativa pelo teste de Tukey (5%) entre os diferentes fungicidas para o parâmetro avaliado, sendo que STL+AZT aumentou, quando comparado ao PTZ+TFS, a taxa de transporte de elétrons (ETR) pelos fotossistemas até os aceptores finais (Figura 18B).

Todos os parâmetros já analisados aqui atuam de maneira efetiva na taxa de assimilação do CO₂ (A) pelas plantas de soja através de ciclo de Calvin-Benson. Portanto, como era de se esperar, o estresse provocado pela aplicação do fungicida PTZ+TFS diminuiu significativamente A quando comparado tanto com as plantas do tratamento controle como quando comparado com as plantas sob efeito de STL+AZT (Figura 19A e B, Apêndice A - Tabela 21) durante todo o período de condução do experimento.

Figura 19. Taxa de assimilação de CO₂ (A). (A) Taxa de assimilação de CO₂ (A) ao longo dos dias. (B) Média da Taxa de assimilação de CO₂ (A) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Apesar de não significativo (Apêndice A - Tabela 21), observa-se que plantas tratadas com STL+AZT tiveram um pequeno aumento na taxa de assimilação de CO₂ quando comparadas com as plantas do tratamento controle (Figura 19B).

4.1.5. Eficiência do uso da água

A análise do conjunto de dados para todos os parâmetros aqui descritos de maneira isolada se faz muito importante, uma vez que cada parâmetro traz diferentes informações sobre cada etapa do processo fotossintético, porém uma análise conjunta da taxa de assimilação de CO₂ (A) versus a condutância estomática (g_s) e transpiração (E)

pode trazer uma informação muito valiosa a respeito da eficiência do uso da água pelas plantas tratadas ou não com os difentes fungicidas.

Um aumento na eficiência do uso da água seria constatado caso houvesse um aumento da taxa de assimilação de CO_2 (A) com uma condutância estomática (g_s) ou transpiração (E) estáveis, ou de outra forma, onde a taxa de assimilação de CO_2 (A) se mantivesse constante com uma consequente diminuição na condutância estomática (g_s) ou na taxa de transpiração (E). Essa correlação é verdadeira uma vez que se utiliza a seguinte fórmula para o cálculo da eficiência do uso da água (EUA) e eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i):

$$\text{EUA} = A/E \quad \text{ou} \quad \text{EUA}_i = A/g_s$$

Isso posto, constatou-se que nenhum dos fungicidas testados alterou de maneira significativa a eficiência do uso da água (EUA) (Apêndice A – Tabela 22) ou mesmo a eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i) (Apêndice A - Tabela 23) para nenhum dos dias avaliados durante a condução do experimento (Figura 20A e C).

Figura 20. Parâmetros da eficiência do uso da água (EUA). (A) Taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre condutância estomática (g_s) ao longo dos dias. (B) Média da taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre condutância estomática (g_s) para os dias analisados. (C) Taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre transpiração (E) ao longo dos dias. (D) Média da taxa de assimilação de CO_2 (A) sobre transpiração (E) para os dias analisados. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

4.1.6. Curva A/Ci e eficiência da Rubisco

Conforme já descrito no item 4.1.3. Trocas gasosas e temperatura foliar, e constatado na Figura 16F, o tratamento com os diferentes fungicidas não alterou de forma significativa a concentração intercelular de CO_2 (C_i), porém, esse resultado contrasta com o esperado quando se cruza a informação onde observa-se uma diminuição significativa na condutância estomática (g_s) (Figura 16B) provocado pela utilização do fungicida PTZ+TFS, uma vez que com uma menor condutância estomática, ou seja, com um menor aporte de CO_2 para os espaços intercelulares, e partindo da premissa que o tratamento com esse fungicida não alterou o comportamento da principal enzima participante no ciclo de Calvin-Benson, a rubisco, deveria ser observado uma diminuição de C_i para as plantas de soja tratadas com o fungicida PTZ+TFS.

Para checar se a premissa de que o tratamento com o fungicida PTZ+TFS não afetou de maneira direta o funcionamento da rubisco foram realizados dois dias de avaliações com a curva A/C_i .

A análise dos dados coletados aos 5 dias após a primeira aplicação e aos 4 dias após a segunda aplicação, revelam que tanto a aplicação do fungicida PTZ+TFS como a aplicação do fungicida STL+AZT não alteram de forma significativa a respiração diurna (R_d^*) (Figura 21A, Apêndice A - Tabela 24), a taxa de transporte de elétrons (J) (baseado no requerimento de NADPH) (Figura 21B, Apêndice A - Tabela 25), a condutância mesofílica (g_m) (Figura 21C, Apêndice A - Tabela 26) nem o uso de triose-fosfato (TPU) (Figura 21D, Apêndice A - Tabela 27) para nenhum dos dias analisados.

Uma análise mais detalhada sobre o conjunto de dados nos permite observar que, mesmo sem uma diferença significativa pelo teste de Tukey (5%) as plantas de soja sob efeito do fungicida STL+AZT demonstraram numericamente, uma redução na taxa de respiração diurna (R_d^*) (Figura 21A), aumento da taxa de transporte de elétrons (J) (Figura 21B), aumento na condutância mesofílica (g_m) (Figura 21C), e aumento no uso de triose-fosfato (TPU) (Figura 21D).

Porém o tratamento com o fungicida PTZ+TFS diminuiu significativamente a velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($V_{c_{\max}}$) (Figura 21E, Apêndice A - Tabela 28) para os dois dias analisados, tanto quanto comparado com as plantas do grupo controle, quanto quando comparado com as plantas tratadas com STL+AZT. A aplicação de STL+AZT não alterou de maneira significativa $V_{c_{\max}}$ quando comparado com as plantas do grupo controle (Figura 21E).

A análise conjunta dos dias avaliados nos permite concluir que a aplicação do tratamento com PTZ+TFS alterou $V_{c_{\max}}$ (Figura 21F), de maneira significativa (Apêndice A - Tabela 28), tanto para 5 dias após a primeira aplicação, quanto para 4 dias após a segunda aplicação. A diminuição em $V_{c_{\max}}$ nos leva a crer que o tratamento com o fungicida PTZ+TFS alterou de maneira permanente a eficiência na taxa de carboxilação pela rubisco, afetando, deste modo, diretamente a taxa de assimilação de CO_2 (A) (Figura 19B). Essa constatação vai ao encontro dos dados observados sobre C_i (Figura 16F), onde mesmo com limitação de trocas gasosas provocadas pela baixa g_s (Figura 16B) as plantas de soja sob efeito de PTZ+TFS não foram capazes de extinguir o CO_2 intercelular (C_i) pelo ciclo de Calvin-Benson.

Figura 21. Parâmetros da curva A/C_i. (A) Respiração diurna (R_d^*). (B) taxa de transporte de elétrons (J). (C) Condutância mesofílica (g_m). (D) Uso de triose-fosfato (TPU). (E) Velocidade máxima de carboxilação da rubisco (V_{cmax}) ao longo dos dias. (F) Média da V_{cmax} entre os dias. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

4.1.7. Número médio de flores por planta

Outro dado muito importante, que em conjunto com a taxa de assimilação de CO₂ (A) pode impactar positiva ou negativamente na produtividade, é a capacidade de retenção de flores pelas plantas de soja. Isso se deve ao fato de que uma maior retenção de flores pode refletir de maneira direta na capacidade produtiva da planta em estudo.

Apesar da flutuação normal que ocorre durante o ciclo de desenvolvimento da soja no número médio de flores por planta, uma análise dos dados nos revela que a utilização do fungicida STL+AZT não alterou de forma significativa pelo teste de Tukey (5%) esse parâmetro (Figura 22A, Apêndice A - Tabela 29), ao longo dos dias avaliados, sendo que em alguns momentos observa-se um aumento na retenção média de flores.

De outra forma observa-se que as plantas de soja sob efeito do fungicida PTZ+TFS possuem uma menor capacidade de retenção de flores (Figura 22A) a partir de 6 dias após a primeira aplicação e se mantendo por quase todo o período avaliado. Essa menor capacidade de retenção de flores se dá de maneira significativa aos 14 e 15 dias após a primeira aplicação (Figura 22B, Apêndice A - Tabela 29).

Figura 22. Número médio de flores por planta ao longo do período avaliado. (A) Número médio de flores por planta durante todo o período de avaliação. (B) Retenção de flores média para os tratamentos aos 14 e 15 dias após a primeira aplicação. (↓) Momento da imposição dos tratamentos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

4.2. Experimento II (Enzimas do sistema antioxidante)

4.2.1. Enzimas do sistema antioxidante

Para se determinar o efeito bioquímico causado pela utilização dos fungicidas STL+AZT e PTZ+TFS às plantas de soja, foram realizadas análises das enzimas do sistema antioxidante das plantas aos 0, 1 e 2 dias após cada aplicação. Os dados serão apresentados separadamente para cada um desses dois períodos de avaliações. A Figura 23 nos revela o comportamento do conteúdo de proteínas totais para o primeiro período de avaliações (Figura 23A), ou seja, os dados referentes aos 0, 1 e 2 dias após a primeira aplicação, assim como os dados para o segundo período de avaliações (Figura 23B), 0, 1 e 2 dias após a segunda aplicação (15, 16 e 17 dias após a primeira aplicação respectivamente).

Apesar de ser observada uma redução numérica no conteúdo de proteínas totais para as plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS um dia após a primeira aplicação (Figura 23A) e para o fungicida SLT+AZT aos 17 dias após a primeira aplicação (2 dias após a segunda aplicação) (Figura 23B), não foi constada diferença significativa (Tukey 5%) (Apêndice A - Tabela 30 e Tabela 31) para este parâmetro em nenhum dos dias avaliados, levando a conclusão que nenhum dos fungicidas afetou de maneira significativa o conteúdo de proteínas totais para nenhum dos dias avaliados durante este estudo. As variações observadas foram ocasionadas por variações diárias normais conforme também ocorreu para as plantas do tratamento controle.

Assim como o proposto para o conteúdo de proteínas totais, os resultados para as enzimas analisadas do sistema antioxidante serão apresentadas de maneira separada para cada um dos períodos de avaliação, ou seja, a Figura 24 nos traz informações sobre a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), glutathione redutase (GR), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dos níveis malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para o primeiro período de avaliações: 0, 1 e 2 dias após a primeira aplicação. Da forma semelhante a Figura 25 revela a atividade enzimática para os mesmo parâmetros acima supracitados, porém neste caso, para o segundo período de avaliações, 0, 1 e 2 dias após a segunda aplicação (15, 16 e 17 dias após a primeira aplicação, respectivamente).

Figura 23. Cinética de proteínas totais ao longo dos dias avaliados. (A) Proteínas totais ao longo dos dias após a primeira aplicação. (B) Proteínas totais ao longo dos dias após a segunda aplicação. (↓) Momento da imposição dos tratamentos.

Para o primeiro período de avaliações, a saber, 0, 1 e 2 dias após a primeira aplicação (Figura 24), nenhuma alteração significativa foi detectada (Apêndice A - Tabela 32 (SOD), Tabela 33 (GR), Tabela 34 (CAT), Tabela 35 (APX) e Tabela 36 (MDA)), para as enzimas do sistema antioxidante em plantas de soja. De forma similar, não foi observado alterações significativas para o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 24, Apêndice A – Tabela 37).

Figura 24. Atividade enzimática do sistema antioxidante e concentração de malondialdeído e peróxido de hidrogênio

após a primeira aplicação. (A) Dismutase do superóxido. (B) Glutathione redutase. (C) Catalase. (D) Peroxidase do ascorbato. (E) Malondialdeído. (F) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (↓) Momento da imposição dos tratamentos.

Uma análise detalhada da Figura 24A nos revela que antes da aplicação dos fungicidas, ou seja, 0 dias após a primeira aplicação, todas as plantas do experimento se encontravam com quantidades similares de conteúdo de dismutase do superóxido (SOD), porém após a imposição dos tratamentos observa-se que as plantas de soja sob efeito da aplicação de PTZ+TFS elevaram, mesmo que não significativamente (Apêndice A - Tabela 32), o conteúdo dessa enzima.

Em paralelo as atividades das enzimas já citadas, observou-se uma tendência na elevação da atividade da enzima glutathione redutase (GR) nas plantas de soja tratadas com o fungicida PTZ+TFS aos 2 dias após a primeira aplicação (Figura 24B), essa alteração não se dá de maneira significativa, porém esse aumento pode indicar, em conjunto com a SOD e APX, que as plantas sob efeito deste fungicida sofreram um estresse maior do que as plantas controle e tratadas com STL+AZT.

Assim como observado para as enzimas, não se observou alterações significativas pelo teste de Tukey (5%) no conteúdo de malondialdeído (MDA) (Figura 24D) para nenhum dos dias subsequentes até 2 dias após a primeira aplicação. O malondialdeído é um produto formado pela decomposição de ácidos graxos das biomembranas e um aumento desse composto poderia estar associado a uma maior degradação das membranas celulares e consequentemente a danos mais sérios e irreversíveis à célula vegetal (LANGARO et al., 2017).

Diferente do que foi constatado no primeiro período de avaliações (0, 1 e 2 dias após a primeira aplicação) (Figura 24), as alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante das plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS foram mais marcantes para o segundo período de avaliações, 0, 1 e 2 dias após a segunda aplicação (15, 16 e 17 dias após a primeira aplicação) (Figura 25). Sendo que neste caso observa-se alterações significativas tanto para a SOD (Figura 25A, Apêndice A - Tabela 38), para a GR (Figura 25B, Apêndice A – Tabela 39) e para o conteúdo de MDA (Figura 25E, Apêndice A - Tabela 42).

Importante ressaltar que todas as plantas já vinham de um primeiro período sob efeito dos fungicidas testados, e que os resultados apresentados para os 15 dias após a primeira aplicação se referem aos 0 dias após a segunda aplicação, ou seja, estes resultados foram coletados antes da segunda imposição dos tratamentos e referem-se ao efeito causado ainda pela primeira aplicação dos fungicidas.

Neste contexto, podemos verificar que as plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS já vinham de um período de estresse ocasionado pela primeira aplicação desse fungicida, e que uma maior atividade da SOD já pode ser verificada mesmo antes da segunda aplicação (Figura 25A).

Essa diferença significativa na atividade da SOD se manteve durante todo o segundo período de avaliações (Figura 25A), mostrando que esse aumento na atividade da enzima está relacionado à imposição dos tratamentos e consequentemente a utilização do fungicida PTZ+TFS.

Corroborando com o constatado para a atividade da SOD, verifica-se também uma maior atividade para enzima GR (Figura 25B), que estaria associada a um segundo passo no processo de eliminação de EROs. Percebe-se neste caso, que a atividade dessa enzima, aumentou significativamente (Apêndice A – Tabela 39) após a segunda aplicação do fungicida PTZ+TFS, gerando uma resposta mais rápida das plantas de soja para o estresse causado por esse fungicida.

Essa resposta mais rápida na atividade da GR para as plantas sob efeito de PTZ+TFS, pode estar associada a uma rápida eliminação de H_2O_2 , fazendo com que alterações nesse parâmetro não fossem detectadas para as plantas de nenhum dos tratamentos analisados (Figura 25F, Apêndice A – Tabela 43).

Figura 25. Atividade enzimática do sistema antioxidante e concentração de malondialdeído e peróxido de hidrogênio após a segunda aplicação. (A) Dismutase do superóxido. (B) Glutamina redutase. (C) Catalase. (D) Peroxidase do ascorbato. (E) Malondialdeído. (F) Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). (↓) Momento da imposição dos tratamentos.

Para esse segundo período de avaliações não foram constatadas alterações significativas na atividade das enzimas catalase (CAT) (Figura 25C, Apêndice A - Tabela 40) e peroxidase do ascorbato (APX) (Figura 25D, Apêndice A – Tabela 41).

Ambas enzimas, assim como GR, estão associadas à eliminação de H_2O_2 , o que nos leva a conclusão que a elevação na atividade da GR (Figura 25B) ocasionada pela aplicação de PTZ+TFS, já esta sendo suficiente para eliminar o excesso de H_2O_2 gerado pelo aumento da atividade da SOD (Figura 25A) causado pela utilização desse fungicida.

Apesar de ser observado uma diminuição no conteúdo de malondialdeído (MDA) (Figura 25E), para as plantas tratadas com PTZ+TFS, acredita-se que o estresse causado pela utilização de ambos os fungicidas não tenha sido altamente severo a ponto de ocasionar oxidação lipídica das biomembranas celulares para nenhum dos fungicidas testados até dois dias após a segunda aplicação.

5. DISCUSSÃO

Nenhum dos fungicidas testados alterou de maneira significativa a “saúde” do aparato fotossintético (Figura 13), não alterando, portanto, a capacidade das plantas em absorver a energia luminosa incidente sobre a lâmina foliar. Esse fato pode ser verificado pela análise dos parâmetros: eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) (Figura 13E) e eficiência quântica máxima (F_v'/F_m') (Figura 13F), onde alterações significativas não foram detectadas para nenhuma das plantas de soja sob influência, tanto do fungicida PTZ+TFS como do fungicida STL+AZT.

Por outro lado, NASON, FARRAR e BARTLETT (2007), testando a aplicação dos fungicidas picoxistrobim (PCS) e piraclostrobina (PRS), verificaram uma redução em F_o e um aumento em F_m , ocasionando consequentemente, uma redução de (F_v/F_m).

O valor de F_v/F_m reflete a eficiência quântica potencial do PSII e é usado como um indicador sensível da performance do aparato fotossintético das plantas, com um valor ótimo em torno de 0,83 (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Isso nos leva a conclusão que a capacidade potencial em absorver a energia incidente nas plantas de soja sob influência de ambos os fungicidas, é mantida, conforme mesmo potencial encontrado para as plantas controle, uma vez que apesar das variações observadas para esses parâmetros, os níveis se encontram ao redor de plantas consideradas com o aparato fotossintético saudável.

Porém, o balanço entre os caminhos de dissipação dessa energia absorvida foi fortemente afetado pela utilização de um ou outro fungicida. A eficiência quântica efetiva do PSII (Φ_{PSII}) é a porção da energia absorvida pelo aparato fotossintético que é realmente utilizado no processo fotoquímico, ou seja, a fração da energia luminosa que realmente será utilizada para assimilação de CO_2 (A) (RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2003). Maiores valores para esse parâmetro nos indicam uma maior eficiência do aparato fotossintético em converter a energia luminosa em fixação de carbono.

A aplicação dos diferentes fungicidas, causou uma alteração significativa (Figura 14C e D) para este parâmetro ao longo de todo o período avaliado. O fungicida PTZ+TFS apresentou uma forte redução em Φ_{PSII} no primeiro dia após a primeira aplicação, sendo que esta redução foi significativa tanto quando foi avaliado as plantas sob efeito de apenas uma aplicação do fungicida (primeiro período de avaliações), como se manteve até o final dos períodos de avaliações.

Em contrapartida a aplicação do fungicida STL+AZT aumentou Φ_{PSII} para todo o período de avaliações do ensaio. Essa diferença em Φ_{PSII} quando se compara as plantas de soja sob efeito dos diferentes fungicidas, se dá de maneira significativa pelo teste de Tukey (5%) tanto quando se compara as plantas sob efeito de apenas uma aplicação dos fungicidas (primeiro período de avaliações) como quando se comparam as plantas sob efeito de duas aplicações dos fungicidas (segundo período de avaliações) (Figura 14C e D).

A utilização de STL+AZT não alterou de maneira significativa Φ_{PSII} quando se compara as plantas de soja sob efeito desse fungicida com as plantas controle, mostrando que a utilização desse fungicida não se mostra como um fator estressante para as plantas de soja.

Esse pequeno aumento em Φ_{PSII} provocado pela utilização de STL+AZT pode estar relacionado com alterações provocadas pela utilização de fungicidas do grupo químico das estrobilurinas (AZT ou PCS) (Figura 3).

Apesar de não terem sido observadas alterações significativas para as outras formas de dissipação de energia, fluorescência e NPQ (Figura 14A e B), a aplicação de PTZ+TFS aumentou significativamente NPQ um dia após a primeira aplicação, se mantendo numericamente superior para todo o período de avaliações.

Controvérsias sobre a eficiência do NPQ em proteger o PSII contra uma fotoinibição, ainda existem na comunidade científica, entretanto a maioria dos estudos “in vivo” estabelecem claramente o papel crucial do NPQ em proteger o PSII contra uma fotoinibição (RUBAN, 2016). Neste contexto RUBAN (2016) propõe que novas abordagens de estudo devem ser adotadas para o completo entendimento do papel de NPQ na proteção contra uma fotoinibição. Esse autor discute que análises bioquímicas são difíceis de serem realizadas, por terem em sua essência uma avaliação destrutiva, outrossim análises que levam em conta a relação F_v/F_m podem ser, muitas vezes, ambíguas. RUBAN (2016) propõe um novo princípio de análise de NPQ que permite um melhor entendimento e quantificação da efetividade da ação fotoprotetiva dessa forma de dissipação de energia. Esse autor propõe, portanto, uma análise comparativa entre Φ_{PSII} e NPQ, dois caminhos de dissipação da energia absorvida pelos complexos coletores de luz (LHCII).

Apesar de RUBAN (2016) utilizar essa abordagem sobre dados de um experimento através da imposição de diferentes intensidades luminosas, o processo de fotoinibição pode ocorrer sobre qualquer intensidade luminosa (FOYER; SHIGEOKA, 2011), sendo neste caso, ocasionado por um fator estressante, incorrendo em aumento na taxa de oxidação de D1 ou diminuição na sua taxa de re-construção (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Em condições normais de funcionamento, a proteína D1, que é o centro de reações do PSII, é oxidada e reconstruída a cada 30 minutos, esse mecanismo de oxidação e re-construção ocorre independente da intensidade luminosa, sendo que uma limitação em ETR ocorre sempre que a taxa de oxidação excede a taxa de re-construção de D1, ocasionando assim aumento em EROs (FOYER; SHIGEOKA, 2011). Esse processo de aumento na taxa de oxidação de D1 e diminuição na taxa de re-construção é chamado de fotoinibição e pode ser ocasionado para qualquer intensidade luminosa (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Dentro deste contexto, a análise proposta por RUBAN (2016) sobre todos os dados coletados durante as avaliações do presente experimento, nos revelam que a aplicação do fungicida PTZ+TFS exerce um estresse sobre as plantas de soja, podendo alterar a taxa de oxidação e reconstrução da proteína D1, o que reduz o ETR (Figura 18) (FOYER; SHIGEOKA, 2011), e consequentemente reduz Φ_{PSII} , levando a um processo de fotoinibição (Figura 26). De maneira oposta, plantas de soja sobre efeito do fungicida STL+AZT revelam que possíveis aumentos observados em NPQ estão mais relacionados com um efeito de fotoproteção do PSII (Figura 26).

A Figura 26 representa uma análise conjunta de todos os dados coletados para as plantas de soja sob influência dos diferentes fungidas e para as plantas controle, conforme proposto por RUBAN (2016). Os testes estatísticos revelam que a regressão quadrática foi a que melhor representou o conjunto de dados, sendo que foi testada a representatividade dos dados para regressão linear, quadrática e cúbica (Apêndice A - Tabela 44). Essa análise nos revela que a regressão quadrática além de melhor representar os dados do experimento, deve ser expressa em três curvas distintas para cada um dos tratamentos, sendo que uma diferença estatística pelo teste de Tukey (5%) foi detectada para as diferentes curvas dos diferentes tratamentos, revelando que a aplicação de PTZ+TFS causa um possível dano no centro de reação do PSII (D1) gerando assim um processo de fotoinibição, mesmo em condições não saturantes de intensidade luminosa. Por não afetar o aparato fotossintético a aplicação de STL+AZT não causa o estresse observado nas plantas sob efeito de PTZ+TFS, sendo que um aumento em NPQ nas plantas tratadas com STL+AZT, pode estar mais relacionado com um processo de fotoproteção, uma vez que aumentos nessa forma de dissipação de energia não diminuem Φ_{PSII} .

Essa redução no rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) está diretamente correlacionada com a redução verificada pela utilização do fungicida PTZ+TFS na taxa efetiva de transporte de elétrons (ETR) (Figura 18).

Essa constatação é verdadeira uma vez que uma redução significativa foi observada para ETR (Figura 18) para as plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS, sendo que tal alteração não foi constatada para as plantas de soja sob efeito do fungicida STL+AZT. Possivelmente o fungicida PTZ+TFS altera de maneira significativa a taxa de oxidação e reconstrução do centro de reações do PSII (D1) incorrendo nas alterações verificadas, tanto para ETR (Figura 18), quanto para Φ_{PSII} (Figura 14).

Figura 26. Relação entre rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) e Dissipação não fotoquímica (NPQ). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Os dados evidenciam assim, a superioridade de STL+AZT sobre PTZ+TFS quando analisamos a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 18B), o que garante uma maior Φ_{PSII} .

A dissipação de energia na forma de NPQ se encontra nos pigmentos localizados no complexo coletor de luz (LHCII) ou pigmentos antena e o aumento ou diminuição nessa forma de dissipação está diretamente correlacionado com a diferença de pH entre o estroma e o lúmen do tilacóide (RUBAN, 2016). A formação de violaxantina está também, diretamente associada às alterações percebidas em NPQ (RUBAN, 2016). Porém, essas alterações em NPQ e consequentemente na formação de violaxantina estão muito mais associadas ao gradiente de prótons (H^+) entre estroma e lúmen, mais especificamente com o pH encontrado no lúmen, que deve girar ao redor de 4,7 pra que uma formação maior em violaxantina seja revelada (RUBAN, 2016).

Importante destacar que uma alteração no gradiente de prótons (H^+) entre o estroma e lúmen, ou em outras palavras uma diferença de pH entre estes dois compartimentos, está intimamente correlacionado com o correto funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, medido pelo ETR (RUBAN, 2016). Isso ocorre pois, durante o perfeito funcionamento de ETR, prótons (H^+) são transportados pela plastoquinona do estroma para o lúmen, modificando assim o gradiente de H^+ entre estes dois compartimentos, alterando portanto a diferença de pH entre estroma e lúmen (TAIZ et al., 2017).

Como já discutido anteriormente, a análise dos dados do item 4.1 (Experimento I (Trocas gasosas e fluorescência)) nos revelam que a utilização do fungicida PTZ+TFS diminuiu de maneira significativa ETR (Figura 18). Constatou-se ainda que as plantas tratadas com o fungicida PTZ+TFS diminuíram significativamente a condutância estomática (g_s) (Figura 16B). Essa redução em g_s pode estar diretamente relacionada com a elevação no

conteúdo de violaxantina induzido pela alteração do pH do lúmen do tilacóide provocado pela redução de ETR (RUBAN, 2016).

Uma análise conjunta dos dados de ETR e g_s , coletados durante o período de avaliação do experimento, nos levam a conclusão que o possível efeito deletério do fungicida PTZ+TFS sobre a taxa de oxidação e reconstrução de D1, ocasiona uma redução em ETR, conforme proposto por RUBAN (2016), sendo que essa redução na taxa de transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto pode incorrer em uma alteração no gradiente de prótons (H^+) entre estroma e lúmen, gerando em consequência um aumento no conteúdo de violaxantina (RUBAN, 2016), o que corrobora com a diminuição de g_s (Figura 16B) constatado nas plantas sob efeito desse fungicida.

Conclui-se, portanto, que a diminuição na condutância estomática (g_s) provocada pela utilização de PTZ+TFS, está diretamente correlacionada com a diminuição verificada em ETR, o que possivelmente está sendo provocada pelo dano ocasionado por esse fungicida em D1. De maneira oposta, alterações significativas não foram observadas para as plantas sob efeito do fungicida STL+AZT, levando a conclusão que esse fungicida não provoca dano no centro de reação do PSII (D1) mantendo um funcionamento de ETR considerado normal e compatível com o verificado para as plantas controle.

Por ser a principal forma de comunicação entre o meio exterior e os espaços intercelulares da folha (TAIZ et al., 2017) modificações na condutância estomática (g_s) estão diretamente associadas com alterações na taxa transpiratória (E) e na concentração intercelular de CO_2 (C_i). Corroborando com essa constatação a diminuição em g_s provocada pela aplicação de PTZ+TFS reduziu significativamente também E (Figura 16C e D) para todos os dias analisados, porém alterações significativas não foram observadas para C_i (Figura 16E e F), o que de certa maneira pode indicar uma redução na taxa de carboxilação da rubisco, uma vez que com a redução das trocas gasosas provocadas pela redução de g_s era esperada uma diminuição na concentração intercelular de CO_2 para as plantas sob efeito desse fungicida.

Apesar de um aumento numérico ser observado, tanto para g_s como para E, alterações significativas não foram observadas para g_s , E e C_i nas plantas sob efeito do fungicida STL+AZT.

O pequeno aumento em E para as plantas sob efeito de STL+AZT, refletiu em uma redução significativa na temperatura foliar (T_f) quando comparada com as plantas de soja sob efeito de PTZ+TFS (Figura 17). De outro lado a redução em E provocado pela utilização de PTZ+TFS refletiu em um aumento da T_f , diferindo significativamente, tanto quando comparado com as plantas controle como quando comparada com as plantas sob efeito de STL+AZT (Figura 17).

Todos os dados discutidos até aqui são evidências irrefutáveis de que a utilização de PTZ+TFS causa um estresse nas plantas de soja, não sendo constatadas alteração significativas para a utilização do fungicida STL+AZT.

Outra importante constatação, que vai ao encontro do já revelado pelos dados, é a evidente diminuição na taxa de assimilação de CO_2 (A) (Figura 19B) verificada quando se utiliza PTZ+TFS, que pode estar sendo influenciada principalmente por uma possível inibição na cadeia transportadora de elétrons (diminuição de ETR) no tilacóide dos cloroplastos, desencadeando o efeito nos outros parâmetros relatados anteriormente (diminuição de Φ_{PSII} , g_s , E e aumento de NPQ e T_f). Assim como o aumento em A nas plantas de soja sob efeito de STL+AZT (Figura 19B) pode ser explicado através do aumento provocado pela ação desse fungicida em outros parâmetros fotossintético, como Φ_{PSII} , qP e ETR, além disso a evidente diminuição em NPQ pode estar atuando também de maneira definitiva no aumento dessas outras vias de dissipação da energia absorvida por LHCII.

Essa flutuação proporcional em g_s , E e A, para ambos os fungicidas, manteve um patamar estável para a eficiência do uso da água (EUA) para todas as plantas do experimento. Não sendo observado, portanto diferenças significativas para nenhum dos dias dentro do período de avaliações.

A não observância de alterações significativas tanto na eficiência do uso da água (EUA, A/E) (Figura 20D) como na eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i, A/ g_s) (Figura 20B) para as plantas de soja sob efeito de PTZ+TFS, deve-se ao fato de que a diminuição constatada em A (Figura 19B) foi seguida também por uma diminuição significativa para a E (Figura 16D), e g_s (Figura 16B). Essa diminuição em ambos os componentes da fórmula utilizada para o cálculo da eficiência do uso da água, fez com que as plantas tratadas com esse fungicida mantivessem uma EUA estável quando comparado com as plantas controle.

De outro lado o evidente aumento na taxa de assimilação de CO₂ (A) (Figura 19B) causada pela aplicação do fungicida STL+AZT está associado a um aumento da condutância estomática (g_s) (Figura 16B) assim como por um aumento significativo na transpiração (E) (Figura 16D), fazendo com que o parâmetro de eficiência do uso da água (EUA) se mantivesse dentro de um patamar estável também para este tratamento, não se diferindo significativamente quando comparado tanto com as plantas do tratamento controle, como quando comparado com as plantas sob efeito de PTZ+TFS (Figura 20B e D).

Ainda dentro do contexto dos dados referentes a trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, uma análise conjunta de ETR versus A (Figura 27) pode nos revelar informações relevantes sobre a eficiência carboxilativa da rubisco. Isso se deve ao fato de que caso seja verificada alta ETR aliado a uma baixa taxa de assimilação de CO₂, podemos inferir que o fator redutor NADPH gerado pela cadeia transportadora de elétrons (ETR) não está sendo utilizado pelo ciclo de Calvin-Benson para aumento na taxa de assimilação de CO₂, através da carboxilação da rubisco, podendo estar sendo utilizado através da oxigenação dessa enzima, gerando a fotorrespiração.

Figura 27. Relação entre taxa de assimilação de CO₂ (A) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

A análise dos dados para a comparação entre estes dois fatores (ETR e A) (Figura 27) nos revelam que não houve alteração significativa para fotorrespiração quando se confronta os tratamentos através do teste de Tukey (5%) (Apêndice A - Tabela 45), sendo que apenas uma curva poderia representar todo o conjunto de dados (Figura 27). Essa observação nos leva a conclusão de que nenhum dos fungicidas testados aumentou a taxa de oxigenação da Rubisco,

não alterando, portanto, a fotorrespiração. Essa constatação pode estar intimamente associada com g_s , uma vez que esse parâmetro regula as trocas gasosas entre os espaços intercelulares e o ambiente externo. Em outras palavras, g_s regula tanto a concentração intercelular de CO_2 (C_i), como a concentração intercelular de O_2 , que é o fator determinante para que ocorra alterações na fotorrespiração.

Como já discutido anteriormente, apesar da redução verificada em A para as plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS, verifica-se concomitantemente uma redução em g_s , limitando a entrada, tanto de CO_2 como do O_2 , nos levando a conclusão de que essa redução em A está possivelmente mais associada a outras alterações fisiológicas, como a redução em ETR e Φ_{PSII} , do que a um aumento na taxa de oxigenação da rubisco (fotorrespiração).

Porém, a não constatação de uma diferença significativa em C_i (Figura 16E e F) para plantas sob efeito desse fungicida nos leva ainda a uma dúvida sobre a eficiência carboxilativa da rubisco, uma vez que com uma diminuição de g_s , ou seja, limitação da entrada de CO_2 para os espaços intercelulares, e partindo do princípio que não houve alteração na eficiência carboxilativa da rubisco, uma diminuição em C_i deveria ser verificada.

Conforme apresentado na Figura 21 (parâmetros da curva A/C_i), não foram constatadas alterações significativas para os parâmetros respiração diurna (R_d), taxa de transporte de elétrons (J , baseado no requerimento de NADPH (SHARKEY et al., 2007)), condutância mesofílica (g_m) e uso de triose fosfato (TPU), porém verificou-se uma diminuição significativa para a velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($V_{c_{max}}$) para as plantas sob efeito de PTZ+TFS. $V_{c_{max}}$ é um parâmetro que nos revela informações sobre a eficiência máxima da carboxilação da rubisco (SHARKEY et al., 2007), em outras palavras podemos dizer que além das limitações em A já verificadas pela utilização de PTZ+TFS, há ainda uma diminuição na eficiência carboxilativa da rubisco.

Essa limitação constatada pela diminuição de $V_{c_{max}}$ pode estar associada a dois principais fatores, diminuição de C_i , que aparentemente não é o caso verificado para o experimento em questão e diminuição na taxa de regeneração da rubisco (SHARKEY et al., 2007), isso ocorre mesmo em condições de altas concentrações intercelulares de CO_2 (C_i), pois mesmo com alto C_i a fotossíntese é limitada pela falta do substrato RuBP (SHARKEY et al., 2007).

Outrossim a limitação em ETR , já verificada anteriormente, diminui em consequência a oxidação do NADPH. Quando isso ocorre, o elétron da ferredoxina reduzida que seria transferido para o NADP vai para o O_2 e forma $O_2^{\cdot-}$ (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008) citado por (BARBOSA et al., 2014).

Aliada a baixa conversão de NADP em NADPH, que é o fator redutor utilizado na fase regenerativa do ciclo de Calvin-Benson, verificou-se um aumento na enzima glutatona redutase (GR) (Figura 25B), enzima que requer NADPH para que sua ação seja revelada.

Neste contexto, a diminuição de $V_{c_{max}}$ verificada para as plantas sob efeito de PTZ+TFS pode estar sendo fortemente limitada pela falta do substrato RuBP, que não é regenerado adequadamente pela falta de fator redutor NADPH.

As alterações constatadas na fase fotoquímica, para ambos os fungicidas, corroboram com o verificado para o comportamento bioquímico das enzimas do sistema antioxidante, dando suporte e reafirmando o já discutido até o presente momento.

Como a capacidade de absorção de energia luminosa não foi afetada pela utilização dos diferentes fungicidas, e alterações significativas na dissipação dessa energia em NPQ e fluorescência não foram detectadas para nenhum dos fungicidas, a energia absorvida pelas plantas de soja sob efeito do fungicida PTZ+TFS pode estar sendo utilizada para a remoção de um elétron da molécula do centro de reação do PSII (D1), porém esse elétron não segue dentro da cadeia transportadora de elétrons (ETR) e pode consequentemente estar sendo desviado dessa rota para outro aceptor final, diminuindo portanto Φ_{PSII} .

O perfeito funcionamento da cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto (CTE) é o que garante que o elétron seja transportado da água até o seu aceptor final, o NADP. Qualquer mudança ou alteração na eficiência de ETR pode ocasionar um desvio dessa rota de transporte de elétrons, tendo, neste caso, como aceptor final o O_2 , gerando, portanto, um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

A alta produção de EROs em plantas superiores é a principal causa de danos irreversíveis ao aparato fotossintético, porém esses compostos são também importantes moléculas sinalizadoras, responsáveis pelo controle do crescimento e desenvolvimento vegetal, assim como os primeiros mensageiros a respostas de aclimação a fatores ambientais estressantes (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

No fotossistema II (PSII), a formação de 1O_2 ocorre quando a energia armazenada na clorofila em seu estado tripleto não é dissipada, sendo então transferida para o O_2 (BARBOSA et al., 2014). Uma característica chave do PSII é sua vulnerabilidade a danos induzidos pela luz, que é considerada uma consequência da produção de 1O_2 no centro de reação, que leva a oxidação irreversível da proteína D1 (VASS; CSER, 2009) citado por (BARBOSA et al., 2014).

A formação do $O_2^{\cdot-}$ durante a fotossíntese acontece na cadeia transportadora de elétrons, no lado aceptor de PSI (Figura 28). A fotoredução do O_2 em $O_2^{\cdot-}$ foi descoberta há pouco mais de meio século, 1951, por Mehler, e é conhecida como “Reação de Mehler” ou fluxo pseudocíclico de elétrons. Apesar da geração de uma EROS, esse fluxo de elétrons evita que moléculas da cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese mantenham-se em estado reduzido e produzam sinais oxidativos que regulam a expressão gênica (FOYER et al., 2012; FOYER; NOCTOR, 2003) citado por (BARBOSA et al., 2014).

Figura 28. Formação de $O_2^{\cdot-}$ e 1O_2 na cadeia de transportadora de elétrons da fotossíntese. Adaptado de (BARBOSA et al., 2014)

Outrossim, a geração de $O_2^{\cdot-}$ nos cloroplastos também pode ser induzida pela baixa concentração de CO_2 , em função do fechamento dos estômatos, resultante de condições estressantes, como salinidade, temperatura elevada (DABROWSKA et al., 2007) ou mesmo qualquer outro fator que possa interferir negativamente neste processo.

Em condições ambientais normais há um balanço entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs), porém sob condições estressantes ocorre um desequilíbrio em favor da produção de EROs. A dismutase do superóxido (SOD) é considerada a primeira linha de defesa das plantas contra estresses oxidativos e para que não haja dano a estruturas celulares essa enzima é a primeira a ser super-expressada, levando a uma diminuição de EROs (BARBOSA et al., 2014).

Isto posto, podemos observar que em um primeiro momento ocorre uma elevação na atividade da SOD, para as plantas sobre efeito da aplicação do fungicida PTZ+TFS (Figura 24A). Um aumento na atividade dessa enzima

não foi detectado para as plantas sob efeito do fungicida SLT+AZT, se mantendo no mesmo nível de atividade das plantas controle e em alguns momentos até mesmo inferior numericamente à essas plantas. Esse aumento no conteúdo de SOD provocado pela utilização do fungicida PTZ+TFS, nos leva a conclusão de que o estresse causado por este fungicida sobre as plantas de soja pode ser maior do que aquele causado pela utilização de STL+AZT, onde alterações na atividade da SOD não foram detectadas.

Como dito a SOD é a primeira linha de defesa antioxidante das plantas superiores e é responsável por catalisar a dismutação de dois radicais $O_2\bullet$ gerando H_2O_2 e O_2 (BARBOSA et al., 2014). O passo seguinte na eliminação de EROs em plantas superiores é catalisado principalmente por duas enzimas, que são as principais responsáveis pela eliminação no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela atividade da SOD, a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da CAT em eliminar o H_2O_2 é efetiva porém, principalmente, em altas concentrações de H_2O_2 (BARBOSA et al., 2014), o que pode explicar o não aumento da atividade dessa enzima nos primeiros dias após a imposição dos tratamentos (Figura 24C). Essa constatação pode estar associada ao período de avaliação dessas enzimas, que se deu apenas até os 2 dias após a aplicação. Espera-se que, com a elevação contínua no conteúdo de SOD, como observado na Figura 24A, ocorra também, com o passar dos dias, uma elevação no conteúdo de H_2O_2 , e consequentemente elevação da CAT e APX.

Diferente do que ocorre para a CAT, que é mais efetiva, preferencialmente, em altas concentrações de H_2O_2 , a peroxidase do ascorbato (APX) requer uma pequena molécula redutora (citocromo c ou tioredoxina) para agir como um co-fator de regeneração, não levando a evolução de O_2 , isto ocorre pois H_2O é o produto desta reação (BARBOSA et al., 2014). Essa característica e a alta afinidade por H_2O_2 permite que a eliminação dessa espécie reativa pela APX ocorra mesmo em baixas concentrações de H_2O_2 (SHARMA et al., 2012).

Neste contexto, apesar de não ser observado alterações significativas pelo teste de Tukey (5%) no conteúdo de APX, observa-se que para as plantas de soja sob efeito do fungicida PTZ+TFS ocorre uma elevação numérica aos 2 dias após a imposição dos tratamentos. Esta observação, em conjunto com o já constatado para o conteúdo de SOD, nos leva a conclusão que o estresse ocasionado pela aplicação do fungicida PTZ+TFS se dá de maneira mais marcante e severa sobre as plantas de soja, gerando uma maior quantidade de EROs, que pode ser prejudicial ao perfeito funcionamento do aparato fotossintético e gerando também um maior dispêndio de energia no acionamento do sistema antioxidante.

Essa elevação no conteúdo de APX corrobora também como o observado para o conteúdo total de H_2O_2 (Figura 24F) que não sofreu alteração significativa pelo teste de Tukey (5%) nem mesmo numérica para as plantas tratadas com ambos os fungicidas. Essa observação vai ao encontro do observado para as atividades tanto da SOD quanto para a atividade da APX. Para as plantas de soja sob efeito do fungicida SLT+AZT não esperava-se que houvesse aumento em H_2O_2 , pois não se observou alterações na atividade da SOD, enquanto que para as plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS, apesar do aumento na atividade da SOD, o H_2O_2 gerado nesse processo pode estar sendo eliminado pela elevação na atividade da APX.

Quando se avaliou as plantas de soja sob efeito de duas aplicações dos fungicidas, alterações significativas e mais marcantes foram observadas quando se utilizou PTZ+TFS (Figura 25). Assim, como já constatado para o primeiro período de avaliações (Figura 24), a SOD sofreu uma elevação significativa para essas plantas, comprovando que há um aumento na quantidade de EROs geradas nessas plantas após a imposição dos tratamentos. As plantas sob efeito de PTZ+TFS além de demonstrarem elevação significativa na quantidade de SOD (Figura 25A), demonstraram

também uma elevação, também significativa, na atividade da glutathione redutase (GR) (Figura 25B), que é uma das enzimas responsáveis pela eliminação de H_2O_2 , geradas pelo aumento na atividade da SOD.

Esse aumento significativo em duas das principais enzimas (SOD e GR) do sistema antioxidante nos levam a conclusão de que a redução em ETR provocada por PTZ+TFS leva a um aumento em EROs nas plantas sob efeito desse fungicida. Aliado a todas as outras alterações fisiológicas já discutidas até o presente momento, uma maior formação de EROs pode incorrer em danos visuais às plantas, representadas por morte celular e fitotoxicidade maior (Figura 37). Todos estes fatores podem reduzir a produtividade geral das lavouras onde se utiliza esse fungicida, podendo essa redução em produtividade ser representada por um menor pegamento e retenção de flores.

Quando se analisa as plantas de soja sob efeito do fungicida STL+AZT, nenhuma alteração, para nenhuma das enzimas do sistema antioxidante foi detectada. Mesmo sob efeito de duas aplicações desses fungicidas, a atividade de todas as enzimas analisadas se mantiveram dentro dos níveis encontrados para as plantas controle (Figura 25). Essa constatação corrobora com o já observado para todos os outros parâmetros de trocas gasosas e fluorescências apresentados nesta dissertação, demonstrando que além de não ter um efeito prejudicial ao perfeito funcionamento do aparato fotossintético STL+AZT pode estar atuando de maneira positiva, representado por um aumento relativo na taxa de assimilação de CO_2 (A) (Figura 19A).

Esse ligeiro aumento em A provocado pela utilização de STL+AZT pode em partes ser explicado pela atividade de azoxistrobina (AZT), que é um ingrediente ativo do grupo das estrobilurinas, sobre a mitocôndrias das plantas de soja, incorrendo em uma elevação na atividade da enzima nitrato redutase (KÖHLE et al., 2002) (Figura 3). Segundo KÖHLE et al. (2002) um aumento na atividade da nitrato redutase provocado pela utilização de fungicidas do grupo químico das estrobilurinas, em especial os princípios ativos PCS e AZT, promove um aumento no crescimento e desenvolvimento das plantas (Figura 3), em outras palavras pode-se dizer que esse aumento na nitrato redutase aumenta o consumo de triose fosfato para processos de crescimento e desenvolvimento das plantas.

Uma análise mais detalhada da Figura 21D, nos mostra que as plantas de soja sob efeito de STL+AZT, apresentam, mesmo que de maneira não significativa, uma elevação para o parâmetro de uso de triose fosfato, para os dois dias analisados, sendo que esse aumento no consumo de triose fosfato pode ser o motor que gerou as alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência, tais como aumento de Φ_{PSII} , qP e ETR e diminuição de NPQ e qN, observados durante a condução do experimento.

Além dessas alterações constatadas para as plantas de soja sob efeito de STL+AZT, observou-se também um aumento significativo em A (Figura 19) e uma maior capacidade de retenção de flores (Figura 22).

Essa maior capacidade de retenção de flores pelas plantas de soja sob efeito do fungicida STL+AZT pode também ser explicada pela alteração provocada pela utilização do princípio ativo AZT, podendo agir de maneira indireta na diminuição da produção de etileno e aumento no conteúdo de giberelinas (Figura 3 e Figura 4). Como consequência dessa diminuição de etileno, pode ocorrer também um atraso na senescência e consequentemente um aumento na retenção de folhas e flores, aumentando potencialmente, portanto, a capacidade produtiva das plantas (KANUNGO; JOSHI, 2014; KÖHLE et al., 2002).

De forma oposta, uma menor retenção de flores observada nas plantas sob efeito de PTZ+TFS, pode ser explicada por apresentarem uma elevação nas enzimas do sistema antioxidante (item 4.2.1) indicando um possível aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse aumento em EROs pode levar a um aumento na produção de etileno, conforme verificado na Figura 4, e consequentemente a uma provável diminuição na retenção de flores pelas plantas de soja, diminuindo assim o potencial produtivo das plantas sob efeito deste fungicida (KANUNGO; JOSHI, 2014).

6. CONCLUSÃO

Em condições normais e não estressantes de crescimento e desenvolvimento, há a transferência da energia absorvida pelos pigmentos antena no complexo coletor de luz do fotossistema II (LHCII) para o centro de reações do PSII (proteína D1) onde as reações químicas armazenam parte dessa energia por transferência de elétrons de um pigmento de clorofila para a plastoquinona A, que é oceptor primário de elétrons dentro do esquema Z de transferência de elétron. A água neste contexto doa um elétron para D1, e reduz, então, a clorofila central do centro de reações do PSII novamente (TAIZ et al., 2017). Essa energia transferida em forma de transferência de elétrons de D1 para a plastoquinona A é mensurada através da eficiência quântica efetiva do PSII (Φ_{PSII}).

A outra parte da energia absorvida por LHCII que não é utilizada na forma de Φ_{PSII} é dissipada na forma de calor (NPQ) ou fluorescência (F), sendo que a energia total absorvida pelos pigmentos antena deve sempre seguir um desses três caminhos de dissipação energética (MULLER, 2001).

A transferência de elétrons e prótons na membrana do tilacóide é realizada vetorialmente pelos quatro complexos proteicos, fotossistema II (PSII), citocromo b_6f (Cyt b_6f), fotossistema I (PSI) e ATP-Sintase. A água é oxidada e os prótons são liberados no lúmen pelo PSII. O PSI reduz o NADP a NADPH no estroma, pela ação da ferredoxina e da flavoproteína ferredoxina-NADP⁺-redutase. Os prótons também são transferidos para o lúmen pelo Cyt b_6f e contribuem para a formação do gradiente eletroquímico de prótons (TAIZ et al., 2017). Dentro deste contexto há ainda a participação da plastocianina (PC) que realiza a transferência de elétrons entre o Cyt b_6f e o PSI.

Toda a transferência de elétrons desde seu doador primário, a água, até o seu aceitor final, o NADP, é mensurado pela taxa de transporte de elétrons (ETR).

Figura 29. Funcionamento do aparato fotossintético para plantas controle

O fator redutor (NADPH) gerado nessa etapa do processo fotoquímico, juntamente com o ATP gerado pela ação da ATP-sintase, que utiliza-se do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela lise da molécula de H_2O , e pela ação da plastoquinona (PQ) e Cyt b_6f na transferência de prótons do estroma para o lúmen, são utilizados no

processo bioquímico do ciclo de Calvin-Benson para a formação de triose-fosfato, que futuramente será utilizada para crescimento e desenvolvimento do vegetal (TAIZ et al., 2017).

Esse esquema do processo fotoquímico envolvendo todos os complexos proteicos é apresentado na Figura 29 e representa o funcionamento do aparato fotossintético para as plantas controle do estudo apresentado nesta dissertação.

As alterações provocadas pela utilização de PTZ+TFS nas trocas gasosas, parâmetros da fluorescência e enzimas do sistema antioxidante sobre o processo fotoquímico e bioquímico, são apresentadas na Figura 30. A aplicação de PTZ+TFS pode ter afetado principalmente a taxa de oxidação e reconstrução da proteína D1, o que gera a redução observada em ETR, corroborando com o já encontrado por FOYER e SHIGEOKA (2011), consequentemente essa alteração em ETR reduz também Φ_{PSII} , levando a um processo de fotoinibição.

Essa alteração na taxa de oxidação e reconstrução de D1, ocasiona um efeito em série sobre vários parâmetros fotossintéticos, como já dito, reduz Φ_{PSII} e ETR, essa redução na taxa de transporte de elétrons, reduz a atividade da plastoquinona e Cyt b_6f em transferir prótons (H^+) do estroma para o lúmen, alterando portanto o gradiente eletroquímico de prótons (H^+) entre estes dois compartimentos, essa redução na transferência de H^+ para o lúmen do tilacóide faz com que o pH do lúmen seja alterado provocando alterações no ciclo das xantofilas e alterando o balanço entre zeaxantina e violaxantina, o que por consequência leva a uma diminuição de g_s .

A diminuição em g_s reduz significativamente as trocas gasosas, principalmente é observada uma redução marcante na taxa transpiratória (E), ocasionando um aumento na temperatura foliar (T_f), verificado pela falta de refrigeração do sistema como um todo.

Além dessas alterações, uma redução na cadeia transportadora de elétrons (ETR) altera significativamente o caminho de transferência de elétrons até seuceptor final o NADP, fazendo com que, além de diminuir a quantidade formada de fator redutor, NADPH, ocorra um desvio dessa rota, tendo, neste caso, como receptor final o O_2 (FOYER; SHIGEOKA, 2011), aumentando a formação de EROs e diminuindo NADPH disponível para o ciclo de Calvin-Benson (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Figura 30. Proposta de funcionamento do aparato fotossintético para plantas sob efeito do fungicida PTZ+TFS

Com o aumento de EROs, verifica-se um aumento significativo em SOD e GR, duas enzimas do sistema antioxidante especializadas na eliminação de O_2^- e H_2O_2 respectivamente. Esse aumento na atividade de GR consome fator redutor NADPH reduzindo ainda mais a quantidade disponível desse fator para o ciclo de Calvin-Benson. O que em última instância provoca uma redução na etapa de regeneração desse ciclo, reduzindo por fim a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) principalmente pela baixa disponibilidade de NADPH requerido durante essa etapa.

O aumento em EROs possivelmente, provoca ainda um aumento na quantidade de etileno, com consequente diminuição na quantidade total de giberelinas, afetando, portanto, a capacidade de retenção de flores, conforme verificado nos dados coletados (KANUNGO; JOSHI, 2014).

Todas essas alterações, tanto de ordem fotoquímica, como fisiológica e bioquímica, afetam a taxa de assimilação de CO_2 , podendo, portanto, afetar a produtividade geral das plantas de soja sob efeito desse fungicida.

A aplicação de PTZ+TFS, apesar de muito utilizada pelos produtores brasileiros, e ser uma das principais ferramentas no controle da ferrugem asiática da soja, provoca alterações fisiológicas e bioquímicas que podem comprometer, em parte, a produtividade da lavoura como um todo.

De forma oposta a aplicação de STL+AZT tem um efeito positivo sobre o funcionamento do aparato fotossintético. As supostas alterações provocadas pela utilização de STL+AZT nas trocas gasosas e parâmetros da fluorescência sobre o processo fotoquímico e bioquímico, assim como o proposto por KOHLE et al., 2002, são apresentadas na Figura 31.

Figura 31. Proposta de funcionamento do aparato fotossintético para plantas sob efeito do fungicida STL+AZT

A aplicação do fungicida STL+AZT, por possuir AZT em sua composição, um ingrediente ativo do grupo químico das estrobilurinas, conforme proposto por KOHLE et al. (2002), afeta de maneira direta a mitocôndria das plantas sob efeito desse fungicida, provocando uma reação em cadeia, com aumento da atividade da enzima nitrato redutase (NR), e consequentemente aumento da assimilação de nitrogênio (N) e estímulo ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BARTLETT et al., 2002; BERTELSEN; DE NEERGAARD; SMEDEGAARD-PETERSEN, 2001). Esse estímulo ao crescimento e desenvolvimento das plantas se dá através do aumento no consumo de triose-fosfato, produzido pelo ciclo de Calvin-Benson.

Propõe-se, portanto, que este aumento no consumo de triose-fosfato, é o motor que gera as alterações fotoquímicas observadas durante as avaliações e coleta de dados do experimento em questão. Com o aumento do consumo de triose-fosfato, constatou-se nas plantas sob efeito desse fungicida um aumento na velocidade máxima de carboxilação da rubisco, com consequente aumento em ETR e Φ_{PSII} , fazendo com que as plantas de soja sob efeito desse fungicida demonstrassem uma maior eficiência fotossintética, medida e constatada através do aumento na taxa de assimilação de CO_2 (A).

Ainda considerando as alterações provocadas pela utilização de AZT, componente integrante de STL+AZT, KOHLE et al., 2002 e KANUNGO; JOSHI (2014) propõe que há um efeito secundário, provocado pelo aumento de óxido nítrico (NO) (Figura 3 e Figura 4) o que induz a uma redução na atividade de etileno e aumento da atividade de giberelinas, levando ao constatado durante o experimento sobre uma maior retenção de flores nas plantas de soja sob efeito desse fungicida.

Todas essas alterações positivas provocadas pela aplicação de STL+AZT nos leva a conclusão que a utilização desse fungicida, além de não causar estresse nas plantas de soja e não alterar significativamente as enzimas do sistema antioxidante, provoca alterações positivas no sentido de estímulo ao crescimento, desenvolvimento, retenção de flores e possivelmente aumento na produtividade geral das lavouras onde este fungicida é utilizado.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 2 jul. 2018.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 167–173, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF03030694>>
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>>
- AMARO, A. C. E. **Efeitos fisiológicos de fungicidas no desenvolvimento de plnatas de pepino japones enxertadas e não enxertadas, cultivadas em ambiente protegido**. 2011. UNESP - Botucatu, [s. l.], 2011.
- AMARO, A. C. E.; RAMOS, A. R. P.; MACEDO, A. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Effects of the fungicides azoxystrobin, pyraclostrobin and boscalid on the physiology of Japanese cucumber. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 228, n. October 2017, p. 66–75, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.016>>
- AMAZONAS, L. **Conjunturas da Agropecuária**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&ved=2ahUKEwiLh_mSwJzdAhUDEpAKHZo7DWIQFjAFegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.conab.gov.br%2Finfo-agro%2Fanalises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista%2Fanalises-do-mercado%2Fhistorico-de-conjunt>.
- APROSOJA. **Uso Diversificado**. 2014. Disponível em: <<https://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/uso-da-soja/>>. Acesso em: 7 fev. 2018.
- ASH, M.; MATIAS, M. **Oil Crops Outlook Demand ProspectsUSDA - Oil Crops Outlook**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/88942/ocs-18e.pdf?v=0>>.
- 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**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x>>
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>>
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. de A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561894%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868034%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17429145.2013.853327%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855484&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ps.520>>
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269771903708>>
- BERTELSEN, J. R.; DE NEERGAARD, E.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Fungicidal effects of azoxystrobin

and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 190–205, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3059.2001.00545.x>>

BILGER, W.; BJORKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 173–185, 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00033159>>

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 425–432, 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00341354>>

BJORKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 489–504, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00402983>>

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. **EMBRAPA-CNPSo. Documentos**, [s. l.], v. 21, p. 61, 1987. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012103900039.xml;BR19871446431>>

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations Revisited, Rebutted. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 77, n. 377, p. 209, 1982. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2287791?origin=crossref>>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>>

CEMBROWSKA-LECH, D.; KOPROWSKI, M.; KĘPCZYŃSKI, J. Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂[–]) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 176, p. 169–179, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161714003538>>

DABROWSKA, G.; KATAI, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. CHARACTERISTICS OF THE PLANT ASCORBATE PEROXIDASE FAMILY. **Acta Biologica Cracoviensia**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 7–17, 2007.

DAREN S. MUELLER. Field Crop Fungicides for the North Central United States. [s. l.], p. 3–16, 2007.

DIAZ-ESPEJO, A.; CUEVAS, M. V.; RIBAS-CARBO, M.; FLEXAS, J.; MARTORELL, 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**, [s. l.], v. 169, n. 4, p. 379–386, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.11.014>>

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 21–25, 1976. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00386001>>

FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 1637–1661, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers013>>

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 119, n. 3, p. 355–364, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x>>

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **PLANT PHYSIOLOGY**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 93–100, 2011. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.166181>>

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)>

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **PLANT PHYSIOLOGY**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.59.2.309>>

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 1330–1337, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653506004899>>

GROSSMANN, K.; KWIATKOWSKI, J.; CASPAR, Gü. Regulation of Phytohormone Levels, Leaf Senescence and Transpiration by the Strobilurin Kresoxim-methyl in Wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 154, n. 5–6, p. 805–808, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161799802624>>

GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory Effects of the Fungicidal Strobilurin Kresoxim-methyl in Wheat (*Triticum aestivum*). **Pesticide Science**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 11–20, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-9063%28199705%2950%3A1%3C11%3A%3AAID-PS556%3E3.0.CO%3B2-8>>

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986168906541>>

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 1–30.

KALAJI, H.; GUO, P. Chlorophyll fluorescence: A useful tool in barley plant breeding programs. **Photochemistry Research Progress**, [s. l.], n. September 2008, p. 447–471, 2008.

KANUNGO, M.; JOSHI, J. Impact of Pyraclostrobin (F-500) on Crop Plants. **Plant Science Today**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 174–178, 2014. Disponível em: <<http://horizonpublishing.com/journals/index.php/PST/article/view/60/37>>

KÖHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. **Modern Fungicides and Antifungal Compounds III**, [s. l.], p. 464, 2002.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 570–576, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81790-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81790-6)>

LAISK, A.; LORETO, F. Determining Photosynthetic Parameters from Leaf CO₂ Exchange and Chlorophyll Fluorescence (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Specificity Factor, Dark Respiration in the Light, Excitation Distribution between Photosystems, Alternative Electro. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 903–912, 1996. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.110.3.903>>

LANGARO, A. C.; AGOSTINETTO, D.; RUCHEL, Q.; GARCIA, J. R.; PERBONI, L. T. Oxidative stress caused by the use of preemergent herbicides in rice crops. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 358–364, 2017. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1806-6690.20170041>>

LIANG, S.; XU, X.; LU, Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves. **Journal of Ginseng Research**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 175–182, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.02.004>>

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/51.345.659>>

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138516301121>>

MOLDES, C. A.; MEDICI, L. O.; ABRAHÃO, O. S.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11738-008-0144-8>>

MULLER, P. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. **PLANT PHYSIOLOGY**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 2001. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.125.4.1558>>

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981. Disponível em: <<https://academic.oup.com/pcp/article/22/5/867/1835201/Hydrogen-Peroxide-is-Scavenged-by>>

NASON, M. A.; FARRAR, J.; BARTLETT, D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 1191–1200, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ps.1443>>

NOGUEIRA, M. C. S. **Experimentação agronômica I - conceitos, planejamento e análise estatística**. 1. ed. Piracicaba.

PHYTUS. **O que são as morfolinás?** 2018. Disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/fungicidas-morfolinás/>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

PICININI, E.; FERNANDES, J. Doenças da soja: diagnose, epidemiologia e controle. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Documentos 16**, [s. l.], p. 105, 2003. Disponível em: <<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=022640>>

RAJA, V.; MAJEED, U.; KANG, H.; ANDRABI, K. I.; JOHN, R. Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 137, p. 142–157, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>>

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 167–173, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576503000389>>

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação De Fungicidas De Acordo Com O Mecanismo De Ação Proposto Pelo Frac**. 2006. UNESP - Botucatu, [s. l.], 2006.

RUBAN, A. V. Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 1903–1916, 2016. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.15.01935>>

SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1035–1040, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x>>

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, [s. l.], v. 2012, p. 1–26, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/>>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. max; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.: s.n.].

VASS, I.; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 200–205, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138509000715>>

VENANCIO, W S; RODRIGUES, M A T; BEGLIOMINI, E; SOUZA, N. L. Physiological Effects of Strobilurin Fungicides on Plants. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 59–68, 2003. Disponível em: <<http://177.101.17.124/index.php/exatas/article/view/814%0Afile:///C:/Users/Roberto/Downloads/814-2430-1-PB.pdf>>

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological Effects of Strobilurin Fungicides on Plants. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 59–68, 2003. Disponível em: <<http://177.101.17.124/index.php/exatas/article/view/814%0Afile:///C:/Users/Roberto/Downloads/814-2430-1-PB.pdf>>

WONG, S.-C.; COWAN, I. R.; FARQUHAR, G. D. Leaf Conductance in Relation to Rate of CO₂ Assimilation: III. Influences of Water Stress and Photoinhibition. **PLANT PHYSIOLOGY**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 830–834, 1985. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.78.4.830>>

WONG, S. C.; COWAN, I. R.; FARQUHAR, G. D. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. **Nature**, [s. l.], v. 282, n. 5737, p. 424–426, 1979. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/282424a0>>

WU, Y.-X.; VON TIEDEMANN, A. Physiological Effects of Azoxystrobin and Epoxiconazole on Senescence and the Oxidative Status of Wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 1–10, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357501925611>>

WU, Y.; VON TIEDEMANN, A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 37–47, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749101001749%5Cnpapers2://publication/uuid/0D3F1BEE-CDCA-459C-82F6-05AC9477A42A>>

YANG, Z.; MIDMORE, D. J. A Model for the Circadian Oscillations in Expression and Activity of Nitrate Reductase in Higher Plants. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 1019–1026, 2005. Disponível em: <<http://academic.oup.com/aob/article/96/6/1019/216469/A-Model-for-the-Circadian-Oscillations-in>>

YORINORI, J. T. Oídio da soja. **Comunicado Técnico Embrapa**, [s. l.], v. 59, p. 1–5, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Tabelas de análise da variância para os fatores analisados.

Tabela 4. Valores médios de clorofila *a* [índice falker de clorofila] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>												<i>Média</i>
	1 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	05 n.s.	06 n.s.	11 n.s.	14 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	19 n.s.	
<i>Controle</i>	34,60	34,52	35,27	34,25	35,42	34,52	31,17	30,77	31,73	31,67	34,02	33,25	33,43
<i>STL+AZT</i>	33,97	34,90	35,43	35,10	35,33	35,30	27,56	29,15	33,38	32,94	32,63	34,16	33,40
<i>PTZ+TFS</i>	33,03	32,46	34,18	34,55	34,50	32,98	27,16	29,40	28,55	29,00	29,90	31,40	31,51
<i>Média</i>	33,87	34,05	34,96	34,63	35,08	34,27	28,79	29,77	31,22	31,23	32,18	32,96	32,80
<i>P Value (interação)</i>	0,6983												
<i>P Value (Produto)</i>	0,0722												
<i>CV (%) Produto</i>	27,8												
<i>CV (%) Interação</i>	14,6												

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 5. Valores médios de clorofila *b* [índice falker de clorofila] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>												<i>Média</i>
	1	02	04	05	06	11	14	15	16	17	18	19	
<i>Controle</i>	9,12	9,15	9,05	8,75	9,43	7,68	7,47	7,22	7,05	7,08	8,02	7,45	8,12 a
<i>STL+AZT</i>	8,95	9,20	9,10	8,82	9,57	8,30	7,86	7,42	7,67	7,86	6,50	7,94	8,28 a
<i>PTZ+TFS</i>	8,23	7,96	8,27	7,77	8,85	7,15	6,54	6,17	5,63	5,70	6,47	6,44	7,12 b
<i>Média</i>	8,77	8,82	8,81	8,44	9,28	7,71	7,30	6,93	6,78	6,89	6,99	7,29	7,85
<i>P Value (interação)</i>	0,9716												
<i>P Value (Produto)</i>	0,0379												
<i>CV (%) Produto</i>	54,9												
<i>CV (%) Interação</i>	22,9												

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 6. Valores médios de fluorescência inicial para plantas adaptadas ao escuro [Fo] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	442,37	438,75	368,42	443,05	456,70	479,53	461,38	456,85	462,83	454,31	450,53
<i>STL+AZT</i>	447,14	439,85	369,64	439,89	454,94	473,30	452,29	453,83	461,97	464,57	449,75
<i>PTZ+TFS</i>	448,76	459,12	374,39	450,59	447,09	475,83	454,23	451,71	458,05	450,72	450,87
<i>Média</i>	446,09	445,91	370,82	444,51	452,91	476,22	455,97	454,13	460,95	456,54	450,38
<i>P Value (interação)</i>	0,4327										
<i>P Value (Produto)</i>	0,7312										
<i>CV (%) Produto</i>	0,0003										
<i>CV (%) Interação</i>	0,0003										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 7. Valores médios de fluorescência máxima para plantas adaptadas ao escuro [F_m] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	2562,20	2631,97	2225,94	2642,40	2634,96	2547,66	2586,09	2549,17	2562,59	2595,35	2571,09
<i>STL+AZT</i>	2551,24	2604,14	2249,15	2628,31	2682,28	2584,95	2550,39	2567,39	2595,28	2662,92	2584,37
<i>PTZ+TFS</i>	2556,13	2517,23	2218,55	2643,14	2617,17	2551,17	2380,55	2493,48	2530,42	2559,18	2521,87
<i>Média</i>	2556,52	2584,45	2231,22	2637,95	2644,80	2561,26	2505,68	2536,68	2562,76	2605,82	2559,11
<i>P Value (int.)</i>	0,1282										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,1065										
<i>CV (%) Produto</i>	0,8										
<i>CV (%) Int.</i>	0,4										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 8. Valores médios de eficiência quântica potencial do PSII [F_v/F_m] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,81	0,82	0,82	0,82	0,83	0,82
<i>STL+AZT</i>	0,82	0,83	0,84	0,83	0,83	0,82	0,82	0,82	0,82	0,83	0,83
<i>PTZ+TFS</i>	0,82	0,82	0,83	0,83	0,83	0,81	0,81	0,82	0,82	0,82	0,82
<i>Média</i>	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,82	0,82	0,82	0,82	0,83	0,82
<i>P Value (int.)</i>	0,0812										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,1477										
<i>CV (%) Produto</i>	6,7										
<i>CV (%) Int.</i>	3,3										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 9. Valores médios de fluorescência inicial para plantas adaptadas ao claro [Fo'] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	464,86	472,74	397,82	460,27	400,19	425,33	421,17	433,80	444,46	446,58	438,77
<i>STL+AZT</i>	472,35	475,91	407,57	465,80	409,71	426,56	425,32	436,16	454,99	449,98	444,27
<i>PTZ+TFS</i>	471,45	442,85	411,26	456,48	400,77	420,68	415,77	422,51	438,92	442,77	433,46
<i>Média</i>	469,55	463,84	405,55	460,85	403,56	424,19	420,75	430,82	446,12	446,44	438,83
<i>P Value (int.)</i>	0,4934										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,2283										
<i>CV (%) Produto</i>	3,1										
<i>CV (%) Int.</i>	1,4										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 10. Valores médios de fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro [Fm'] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	1156,1	1250,0 a	1014,2	1062,6	767,2	794,9	806,6	856,6	859,9	879,7	941,1
<i>STL+AZT</i>	1217,3	1251,2 a	1038,2	1099,8	813,4	828,5	848,9	878,3	903,6	891,8	973,9
<i>PTZ+TFS</i>	1175,4	998,2 b	1030,4	1034,1	768,8	793,8	805,4	823,8	850,0	875,0	909,4
<i>Média</i>	1182,9	1166,5	1027,6	1065,5	783,1	805,7	820,3	852,9	871,1	882,2	941,5
<i>P Value (interação)</i>	0,0098										
<i>P Value (Produto)</i>	0,1262										
<i>CV (%) Produto</i>	4,1										
<i>CV (%) Interação</i>	1,8										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 11. Valores médios de eficiência quântica máxima do PSII [F_v'/F_m'] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	0,59	0,62 a	0,61	0,57	0,48	0,46	0,48	0,49	0,48	0,49	0,52
<i>STL+AZT</i>	0,61	0,62 a	0,61	0,58	0,50	0,48	0,50	0,50	0,49	0,49	0,53
<i>PTZ+TFS</i>	0,60	0,55 b	0,60	0,56	0,47	0,47	0,48	0,48	0,48	0,49	0,51
<i>Média</i>	0,60	0,60	0,60	0,57	0,48	0,47	0,48	0,49	0,48	0,49	0,52
<i>P Value (interação)</i>	0,0084										
<i>P Value (Produto)</i>	0,1199										
<i>CV (%) Produto</i>	7,2										
<i>CV (%) Interação</i>	3,4										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 12. Valores médios do rendimento quântico efetivo do PSII [Φ_{PSII}] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02	04	11	15	16	17	18	22	
<i>Controle</i>	0,45	0,47	0,44	0,39	0,26	0,23	0,26	0,27	0,27	0,26	0,32 ab
<i>STL+AZT</i>	0,46	0,47	0,44	0,40	0,29	0,27	0,29	0,29	0,28	0,26	0,34 a
<i>PTZ+TFS</i>	0,45	0,39	0,43	0,36	0,24	0,21	0,24	0,25	0,25	0,25	0,30 b
<i>Média</i>	0,45	0,44	0,44	0,38	0,26	0,23	0,26	0,27	0,27	0,26	0,32
<i>P Value (interação)</i>	0,3969										
<i>P Value (Produto)</i>	0,0262										
<i>CV (%) Produto</i>	8,1										
<i>CV (%) Interação</i>	3,9										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 13. Valores médios da dissipação não fotoquímica ou dissipação na forma de calor [NPQ] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	1,26	1,14 b	1,19	1,50	2,45	2,24	2,23	2,00	2,00	1,97	1,83
<i>STL+AZT</i>	1,12	1,11 b	1,17	1,40	2,31	2,15	2,04	1,95	1,89	2,01	1,74
<i>PTZ+TFS</i>	1,20	1,56 a	1,17	1,59	2,46	2,23	1,99	2,08	1,99	1,93	1,85
<i>Média</i>	1,19	1,27	1,18	1,50	2,41	2,21	2,08	2,01	1,96	1,97	1,81
<i>P Value (interação)</i>	0,0165										
<i>P Value (Produto)</i>	0,2224										
<i>CV (%) Produto</i>	31,3										
<i>CV (%) Interação</i>	18,9										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 14. Valores médios da proporção de centros de reação do PSII “abertos” [qP] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02	04	11	15	16	17	18	22	
<i>Controle</i>	0,77	0,76	0,73	0,68	0,54	0,48	0,54	0,55	0,55	0,52	0,60 ab
<i>STL+AZT</i>	0,76	0,76	0,73	0,70	0,58	0,55	0,58	0,59	0,58	0,53	0,63 a
<i>PTZ+TFS</i>	0,75	0,70	0,72	0,64	0,51	0,45	0,51	0,52	0,52	0,50	0,57 b
<i>Média</i>	0,76	0,74	0,72	0,67	0,54	0,49	0,54	0,55	0,55	0,52	0,60
<i>P Value (int.)</i>	0,9609										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,048										
<i>CV (%) Produto</i>	18,1										
<i>CV (%) Int.</i>	7,9										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 15. Valores médios da dissipação de energia não radiativa em calor [qN] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	0,67	0,64 a	0,66	0,72	0,84	0,82	0,82	0,80	0,80	0,80	0,76
<i>STL+AZT</i>	0,64	0,63 a	0,66	0,71	0,82	0,81	0,80	0,79	0,79	0,80	0,75
<i>PTZ+TFS</i>	0,66	0,73 b	0,66	0,73	0,84	0,82	0,80	0,81	0,80	0,80	0,77
<i>Média</i>	0,66	0,67	0,66	0,72	0,83	0,82	0,81	0,80	0,80	0,80	0,76
<i>P Value (int.)</i>	0,0037										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,1299										
<i>CV (%) Produto</i>	16,1										
<i>CV (%) Int.</i>	12,3										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 16. Valores médios de condutância estomática [g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02	04	11	15	16	17	18	22	
<i>Controle</i>	0,49	0,56	0,62	0,38	0,08	0,10	0,16	0,20	0,19	0,18	0,28 a
<i>STL+AZT</i>	0,60	0,48	0,52	0,42	0,11	0,12	0,17	0,19	0,22	0,18	0,29 a
<i>PTZ+TFS</i>	0,60	0,20	0,44	0,38	0,08	0,09	0,13	0,15	0,15	0,18	0,23 b
<i>Média</i>	0,56	0,41	0,53	0,39	0,09	0,10	0,15	0,18	0,18	0,18	0,27
<i>P Value (interação)</i>	0,1498										
<i>P Value (Produto)</i>	0,0001										
<i>CV (%) Produto</i>	11,2										
<i>CV (%) Interação</i>	20,3										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 17. Valores médios de transpiração [E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)										Média
	0	01	02	04	11	15	16	17	18	22	
<i>Controle</i>	8,53	6,78	7,41	5,05	1,87	2,05	3,30	3,69	3,96	3,65	4,48 a
<i>STL+AZT</i>	9,40	6,08	6,66	5,35	2,35	2,38	3,53	3,64	4,30	3,54	4,62 a
<i>PTZ+TFS</i>	9,78	3,62	6,14	5,06	1,83	1,75	2,90	2,93	3,26	3,50	3,97 b
Média	9,23	5,49	6,74	5,15	2,01	2,06	3,24	3,42	3,84	3,56	4,36
P Value (interação)	0,5009										
P Value (Produto)	0,0001										
CV (%) Produto	11,2										
CV (%) Interação	25,1										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 18. Valores médios de concentração intercelular de CO₂ [C_i, μmol CO₂ mol⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)										Média
	0 n.s.	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	234,5	267,8	276,4	240,1	177,7	201,0	221,9	243,5	235,2	232,3	230,8
<i>STL+AZT</i>	265,3	252,6	259,4	235,8	161,7	192,3	213,4	228,7	240,6	228,0	226,1
<i>PTZ+TFS</i>	265,9	219,6	255,6	240,1	151,5	183,4	215,1	221,5	219,1	237,3	219,1
Média	255,2	246,7	263,8	238,7	163,7	192,2	216,8	231,2	231,6	232,6	225,38
P Value (interação)	0,3896										
P Value (Produto)	0,1387										
CV (%) Produto	28,1										
CV (%) Interação	15,8										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância

Tabela 19. Valores médios da temperatura foliar [T_f , °C] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	31,03	30,19 b	27,87	27,67	30,53	30,07	30,05	29,37	29,71	30,06	29,75 b
<i>STL+AZT</i>	30,80	30,49 b	28,21	27,65	30,34	29,69	29,82	29,58	29,46	29,87	29,66 b
<i>PTZ+TFS</i>	30,35	32,07 a	28,38	27,97	30,51	30,00	30,22	29,96	30,02	29,92	30,02 a
<i>Média</i>	30,73	30,92	28,15	27,76	30,46	29,92	30,03	29,64	29,73	29,95	29,81
<i>P Value (interação)</i>	0,0104										
<i>P Value (Produto)</i>	0,0059										
<i>CV (%) Produto</i>	3,9										
<i>CV (%) Interação</i>	3,8										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 20. Valores médios da taxa de transporte de elétrons [ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>										<i>Média</i>
	0	01	02	04	11	15	16	17	18	22	
<i>Controle</i>	198,53	204,73	192,93	169,16	112,81	98,50	113,10	117,60	116,48	112,81	141,07 ab
<i>STL+AZT</i>	203,33	204,71	193,46	175,90	125,07	116,79	126,95	128,91	124,54	115,91	149,35 a
<i>PTZ+TFS</i>	195,54	171,59	187,94	157,92	106,23	91,85	106,54	109,24	108,44	108,69	131,58 b
<i>Média</i>	199,13	193,67	191,45	167,66	114,70	102,38	115,53	118,58	116,49	112,47	140,67
<i>P Value (int.)</i>	0,3884										
<i>P Value (Prod.)</i>	0,0267										
<i>CV (%) Produto</i>	25,3										
<i>CV (%) Int.</i>	11,4										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 21. Valores médios da assimilação de CO₂ [A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)										Média
	0	01	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	26,60	27,13 a	28,81	22,26	9,35	10,25	12,92	14,29	14,21	13,76	17,39 a
<i>STL+AZT</i>	26,50	27,22 a	27,89	23,18	12,47	12,87	15,04	15,41	15,60	14,22	18,57 a
<i>PTZ+TFS</i>	26,27	17,11 b	26,12	20,96	9,91	9,71	11,57	12,55	12,70	12,97	15,45 b
Média	26,46	23,82	27,61	22,13	10,58	10,94	13,18	14,09	14,17	13,65	17,14
P Value (interação)	0,021										
P Value (Produto)	0,001										
CV (%) Produto	18,2										
CV (%) Interação	16,1										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 22. Valores médios de eficiência do uso da água [EUA, A/E, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$] para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)										Média
	0 n.s.	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	3,30	4,55	3,89	4,73	4,90	5,03	3,97	3,90	3,62	3,80	4,18
<i>STL+AZT</i>	2,87	5,26	4,20	4,83	5,41	5,47	4,31	4,24	3,65	4,04	4,44
<i>PTZ+TFS</i>	2,71	4,88	4,24	4,47	5,65	5,53	4,00	4,36	3,91	3,76	4,36
Média	2,96	4,90	4,11	4,68	5,32	5,34	4,09	4,17	3,73	3,87	4,33
P Value (interação)	0,9557										
P Value (Produto)	0,2247										
CV (%) Produto	5,8										
CV (%) Interação	3,1										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 23. Valores médios de eficiência intrínseca do uso da água [EUA_i, A/g_s, μmol CO₂ (mol H₂O)⁻¹] para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)										Média
	0 n.s.	01 n.s.	02 n.s.	04 n.s.	11 n.s.	15 n.s.	16 n.s.	17 n.s.	18 n.s.	22 n.s.	
<i>Controle</i>	68,27	55,90	46,86	72,20	115,34	100,95	85,99	72,52	77,20	79,18	79,05
<i>STL+AZT</i>	49,46	65,24	57,60	74,44	124,36	105,62	90,66	81,30	73,53	82,01	81,62
<i>PTZ+TFS</i>	47,86	88,42	60,42	72,56	131,98	112,50	90,72	87,03	87,94	76,52	86,92
Média	55,20	69,85	54,96	73,07	123,90	106,36	89,12	80,28	79,55	79,24	82,53
P Value (interação)	0,4099										
P Value (Produto)	0,0930										
CV (%) Produto	18,8										
CV (%) Interação	11,7										

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 24. Valores médios de respiração diurna [R_d, μmol m⁻² s⁻¹] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	5 n.s.	19 n.s.	
<i>Controle</i>	1,63	1,57	1,60
<i>STL+AZT</i>	1,56	1,63	1,59
<i>PTZ+TFS</i>	1,68	1,70	1,69
Média	1,63	1,63	1,63
P Value (interação)	0,8922		
P Value (Produto)	0,9428		
CV (%) Produto	25,15		
CV (%) Interação	36,62		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 25. Valores médios da taxa de transporte de elétrons [J , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	5 n.s.	19 n.s.	
<i>Controle</i>	117,36	99,28	109,15
<i>STL+AZT</i>	111,33	109,65	110,56
<i>PTZ+TFS</i>	103,85	93,33	99,65
Média	110,85	101,28	106,66
P Value (interação)	0,308		
P Value (Produto)	0,2699		
CV (%) Produto	13,66		
CV (%) Interação	15,48		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 26. Valores médios de condutância mesofílica [g_m , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	5 n.s.	19 n.s.	
<i>Controle</i>	19,92	16,84	18,52
<i>STL+AZT</i>	23,12	20,64	21,99
<i>PTZ+TFS</i>	22,32	16,74	20,09
Média	21,79	18,17	20,20
P Value (interação)	0,9324		
P Value (Produto)	0,4148		
CV (%) Produto	13,66		
CV (%) Interação	15,48		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 27. Valores médios de uso de triose fosfato [TPU, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	5 n.s.	19 n.s.	
<i>Controle</i>	6,47	6,76	6,60
<i>STL+AZT</i>	6,82	7,87	7,29
<i>PTZ+TFS</i>	6,28	6,74	6,46
Média	6,52	7,15	6,80
P Value (interação)	0,7083		
P Value (Produto)	0,1334		
CV (%) Produto	13,21		
CV (%) Interação	17,71		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 28. Valores médios de velocidade máxima de carboxilação da rubisco [$V_{c\text{máx}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] obtido através da curva A/C_i para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	5	19	
<i>Controle</i>	116,26	74,49	97,27 ab
<i>STL+AZT</i>	115,32	81,22	99,82 a
<i>PTZ+TFS</i>	96,89	69,96	86,12 b
Média	109,49	75,60	94,66
P Value (interação)	0,6244		
P Value (Produto)	0,0482		
CV (%) Produto	3,37		
CV (%) Interação	3,02		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 29. Valores médios de número médio de flores por planta para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>													<i>Média</i>
	0	01	02	04	05	06	11	14	15	16	17	18	19	
<i>Controle</i>	13,33	17,83	23,00	29,00	24,50	18,33	20,83	23,50	36,00 a	32,67	35,00	38,17	26,00	26,01 a
<i>STL+AZT</i>	15,33	16,83	21,67	28,33	25,67	21,00	25,33	22,50	29,50 ab	31,67	32,83	34,33	28,80	25,64 a
<i>PTZ+TFS</i>	15,33	17,50	21,17	31,00	24,67	18,33	15,83	14,33	20,17 b	22,83	28,33	31,83	26,20	22,06 b
<i>Média</i>	14,67	17,39	21,94	29,44	24,94	19,22	20,67	20,11	28,56	29,06	32,06	34,78	26,94	24,58
<i>P Value (int.)</i>	0,0135													
<i>P Value (Prod.)</i>	0,0065													
<i>CV (%) Produto</i>	23,6													
<i>CV (%) Int.</i>	18,7													

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 30. Valores médios de conteúdo de proteínas totais para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	0,33	0,32	0,33
<i>STL+AZT</i>	0,37	0,36	0,37
<i>PTZ+TFS</i>	0,27	0,32	0,29
<i>Média</i>	0,32	0,34	0,33
<i>P Value (interação)</i>	0,4741		
<i>P Value (Produto)</i>	0,3411		
<i>CV (%) Produto</i>	23,29		
<i>CV (%) Interação</i>	15,65		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 31. Valores médios de conteúdo de proteínas totais para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	16^{n.s.}	17^{n.s.}	
<i>Controle</i>	0,28	0,33	0,30
<i>STL+AZT</i>	0,24	0,30	0,26
<i>PTZ+TFS</i>	0,26	0,33	0,30
Média	0,26	0,32	0,29
P Value (interação)	0,9152		
P Value (Produto)	0,5295		
CV (%) Produto	22,72		
CV (%) Interação	9,64		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 32. Valores médios da atividade da dismutase do superóxido [SOD, unidade(SOD)(mg proteína)⁻¹] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

Produto	Época de Avaliação (Dias após a 1.^a aplicação)		Média
	1^{n.s.}	2^{n.s.}	
<i>Controle</i>	19,75	25,72	22,73
<i>STL+AZT</i>	16,13	18,59	17,36
<i>PTZ+TFS</i>	23,28	30,79	26,28
Média	19,72	24,31	21,88
P Value (interação)	0,8783		
P Value (Produto)	0,38,15		
CV (%) Produto	37,36		
CV (%) Interação	27,30		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 33. Valores médios da atividade da glutatona redutase [GR, $\mu\text{mol}(\text{GR})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	0,37	0,31	0,34
<i>STL+AZT</i>	0,29	0,28	0,29
<i>PTZ+TFS</i>	0,32	0,38	0,35
<i>Média</i>	0,33	0,32	0,33
<i>P Value (interação)</i>	0,3075		
<i>P Value (Produto)</i>	0,3744		
<i>CV (%) Produto</i>	22,26		
<i>CV (%) Interação</i>	19,37		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 34. Valores médios da atividade da catalase [CAT, $\mu\text{mol}(\text{CAT})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	77,44	65,52	71,48
<i>STL+AZT</i>	60,24	51,91	56,08
<i>PTZ+TFS</i>	69,03	62,07	65,55
<i>Média</i>	68,90	59,84	64,37
<i>P Value (interação)</i>	0,9384		
<i>P Value (Produto)</i>	0,6963		
<i>CV (%) Produto</i>	46,94		
<i>CV (%) Interação</i>	19,37		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 35. Valores médios da atividade da peroxidase do ascorbato [APX, $\mu\text{mol}(\text{APX})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	0,58	0,51	0,55
<i>STL+AZT</i>	0,43	0,41	0,42
<i>PTZ+TFS</i>	0,41	0,67	0,54
<i>Média</i>	0,47	0,53	0,50
<i>P Value (interação)</i>	0,3619		
<i>P Value (Produto)</i>	0,7279		
<i>CV (%) Produto</i>	59,71		
<i>CV (%) Interação</i>	40,08		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 36. Valores médios do conteúdo de malondialdeído [MDA, $\text{nmol}(\text{MDA})(\text{g matéria fresca})^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	50,06	47,40	48,73
<i>STL+AZT</i>	64,57	43,21	53,89
<i>PTZ+TFS</i>	46,56	33,98	40,27
<i>Média</i>	53,73	41,53	47,63
<i>P Value (interação)</i>	0,0631		
<i>P Value (Produto)</i>	0,2604		
<i>CV (%) Produto</i>	25,53		
<i>CV (%) Interação</i>	11,29		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 37. Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio [H_2O_2 , $\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O}_2)/(\text{g}$ matéria fresca) $^{-1}$] para o primeiro período de avaliações (1 e 2 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	1 n.s.	2 n.s.	
<i>Controle</i>	14389,44	10376,67	12383,06
<i>STL+AZT</i>	10097,78	11503,89	10800,83
<i>PTZ+TFS</i>	9955,56	10533,33	10244,44
<i>Média</i>	11480,93	10804,63	11142,78
<i>P Value (interação)</i>	0,2046		
<i>P Value (Produto)</i>	0,6038		
<i>CV (%) Produto</i>	32,20		
<i>CV (%) Interação</i>	22,19		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 38. Valores médios da atividade da dismutase do superóxido [SOD, unidade(SOD)(mg proteína) $^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16	17	
<i>Controle</i>	28,40	20,84	24,62 b
<i>STL+AZT</i>	27,16	22,82	25,42 b
<i>PTZ+TFS</i>	33,00	32,73	32,84 a
<i>Média</i>	29,08	25,79	27,44
<i>P Value (interação)</i>	0,8379		
<i>P Value (Produto)</i>	0,0174		
<i>CV (%) Produto</i>	12,91		
<i>CV (%) Interação</i>	21,97		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 39. Valores médios da atividade da glutatona redutase [GR, $\mu\text{mol}(\text{GR})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16	17	
<i>Controle</i>	0,38	0,39	0,38 b
<i>STL+AZT</i>	0,45	0,38	0,42 ab
<i>PTZ+TFS</i>	0,63	0,52	0,57 a
<i>Média</i>	0,47	0,44	0,45
<i>P Value (interação)</i>	0,0622		
<i>P Value (Produto)</i>	0,0311		
<i>CV (%) Produto</i>	20,01		
<i>CV (%) Interação</i>	9,65		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 40. Valores médios da atividade da catalase [CAT, $\mu\text{mol}(\text{CAT})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16 n.s.	17 n.s.	
<i>Controle</i>	99,31	85,72	92,52
<i>STL+AZT</i>	96,55	89,25	93,63
<i>PTZ+TFS</i>	103,95	99,79	101,45
<i>Média</i>	99,44	91,88	95,66
<i>P Value (interação)</i>	0,9815		
<i>P Value (Produto)</i>	0,3440		
<i>CV (%) Produto</i>	12,02		
<i>CV (%) Interação</i>	23,60		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 41. Valores médios da atividade da peroxidase do ascorbato [APX, $\mu\text{mol}(\text{APX})(\text{mg proteína})^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16 n.s.	17 n.s.	
<i>Controle</i>	0,31	0,57	0,44
<i>STL+AZT</i>	0,61	0,56	0,59
<i>PTZ+TFS</i>	0,73	0,60	0,65
<i>Média</i>	0,32	0,34	0,33
<i>P Value (interação)</i>	0,6032		
<i>P Value (Produto)</i>	0,3566		
<i>CV (%) Produto</i>	38,35		
<i>CV (%) Interação</i>	62,44		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 42. Valores médios do conteúdo de malondialdeído [MDA, $\text{nmol}(\text{MDA})(\text{g matéria fresca})^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16	17	
<i>Controle</i>	59,76	41,46	52,44 a
<i>STL+AZT</i>	47,83	42,87	45,35 ab
<i>PTZ+TFS</i>	36,73	34,04	35,38 b
<i>Média</i>	48,11	39,20	43,92
<i>P Value (interação)</i>	0,4808		
<i>P Value (Produto)</i>	0,0331		
<i>CV (%) Produto</i>	14,56		
<i>CV (%) Interação</i>	18,98		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 43. Valores médios do conteúdo peróxido de hidrogênio [H_2O_2 , $\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O}_2)/(\text{g}$ matéria fresca) $^{-1}$] para o segundo período de avaliações (1 e 2 dias após a segunda aplicação ou 16 e 17 dias após a primeira aplicação) para produtos e épocas de avaliação.

<i>Produto</i>	<i>Época de Avaliação (Dias após a 1.ª aplicação)</i>		<i>Média</i>
	16 n.s.	17 n.s.	
<i>Controle</i>	14525,00	13092,50	13952,00
<i>STL+AZT</i>	18970,56	17226,11	18098,33
<i>PTZ+TFS</i>	16061,11	12351,11	14206,11
<i>Média</i>	16518,89	14364,58	15505,10
<i>P Value (interação)</i>	0,957		
<i>P Value (Produto)</i>	0,1053		
<i>CV (%) Produto</i>	18,12		
<i>CV (%) Interação</i>	42,26		

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 44. Teste de efeito para Φ_{PSII} x NPQ (Rendimento quântico efetivo do PSII versus dissipação não fotoquímica na forma de calor)

<i>Fonte</i>	<i>Nparm</i>	<i>DF</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob>F</i>
<i>Produto</i>	2	2	0,01267187	6,0104	0,0031*
<i>NPQ (Regressão Linear)</i>	1	1	0,22796141	216,2494	<0,0001*
<i>NPQ*NPQ (Regressão quadrática)</i>	1	1	0,05476050	51,9471	<0,0001*
<i>NPQ*NPQ*NPQ (Regressão cúbica)</i>	1	1	0,00035274	0,3346	0,5638
<i>Produto*NPQ</i>	2	2	0,00497935	2,3618	0,0979
<i>R quadrado</i>	0,86879				

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 45. Teste de efeito para A x ETR (taxa de assimilação de CO₂ versus taxa de transporte de elétrons).

<i>Fonte</i>	<i>Nparm</i>	<i>DF</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob>F</i>
<i>Produto</i>	2	2	11,7163	0,8222	0,4415
<i>ETR (Regressão Linear)</i>	1	1	1497,5329	197,5412	<0,0001*
<i>ETR*ETR (Regressão quadrática)</i>	1	1	6,2529	0,8776	0,3504
<i>ETR*ETR*ETR (Regressão cúbica)</i>	1	1	2,4963	0,3503	0,5548
<i>Produto*ETR</i>	2	2	19,3230	1,3560	0,2609
<i>R quadrado</i>	0,852157				

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 46. Teste de efeito para A x E (taxa de assimilação de CO₂ versus transpiração).

<i>Fonte</i>	<i>Nparm</i>	<i>DF</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob>F</i>
<i>Produto</i>	2	2	46,5632	2,9890	0,0534
<i>E (Regressão Linear)</i>	1	1	2409,7248	309,3716	<0,0001*
<i>E * E (Regressão quadrática)</i>	1	1	1,3662	0,1754	0,6760
<i>E * E * E (Regressão cúbica)</i>	1	1	19,8088	2,5431	0,1130
<i>Produto*E</i>	2	2	10,3784	0,6662	0,5152
<i>R quadrado</i>	0,909657				

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 47. Teste de efeito para A x g_s (taxa de assimilação de CO₂ versus condutância estomática).

<i>Fonte</i>	<i>Nparm</i>	<i>DF</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob>F</i>
<i>Produto</i>	2	2	35,4865	4,0751	0,0190*
<i>g_s (Regressão Linear)</i>	1	1	2964,4633	680,8506	<0,0001*
<i>g_s * g_s (Regressão quadrática)</i>	1	1	117,4066	26,9649	<0,001*
<i>g_s * g_s * g_s (Regressão cúbica)</i>	1	1	0,1610	0,0370	0,8478
<i>Produto* g_s</i>	2	2	6,6121	0,7593	0,4698
<i>R quadrado</i>	0,909657				

Médias nas colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

APÊNDICE B. Material suplementar (figuras não adicionadas no corpo da dissertação)

Figura 32. Parâmetros fotoquímicos da fluorescência da clorofila *a* um dia após a imposição dos tratamentos. (A) Fluorescência máxima para plantas adaptadas ao claro (F_m') um dia após a primeira aplicação. **(B)** Eficiência quântica máxima do PSII (F_v'/F_m') um dia após a primeira aplicação.

Figura 33. Dissipação não fotoquímica um dia após a imposição dos tratamentos. (A) Dissipação não fotoquímica (NPQ) um dia após a imposição dos tratamentos. **(B)** Média da proporção de PSII "fechado" (q_N) um dia após a imposição dos tratamentos.

Figura 34. Relações entre parâmetros fotossintéticos. (A) relação entre A/C_i ao longo dos dias. (B) Média da relação entre A/C_i ao longo dos dias. (C) relação entre Φ_{PSII}/NPQ ao longo dos dias. (D) Média da relação entre Φ_{PSII}/NPQ ao longo dos dias. (E) relação entre A/ETR ao longo dos dias. (F) Média da relação entre A/ETR ao longo dos dias (↓) Momento da imposição dos tratamentos.

Figura 35. Eficiência do uso da água. (A) relação entre A e E para inferência da eficiência do uso da água. (B) relação entre A e g_s para inferência da eficiência intrínseca do uso da água.

Figura 36. Aspecto das plantas de soja 17 dias após a primeira aplicação

Figura 37. Detalhe da fitotoxicidade de PTZ+TFS, 22 dias após a primeira aplicação.