

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ /  
CAMPUS DOIS VIZINHOS – CURSO DE BACHARELADO EM  
AGRONOMIA

ADRIANO LEWANDOWSKI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NA CULTURA DA SOJA PELO  
TRATAMENTO COM PRODUTOS A BASE DE FOSFITOS,  
ACIBENZOLAR-S-METIL EM ASSOCIAÇÃO COM FUNGICIDAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2016

ADRIANO LEWANDOWSKI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NA CULTURA DA SOJA PELO  
TRATAMENTO COM PRODUTOS A BASE DE FOSFITOS,  
ACIBENZOLAR-S-METIL EM ASSOCIAÇÃO COM FUNGICIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof.Dr. Sérgio Miguel Mazaro

DOIS VIZINHOS

2016



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Dois Vizinhos  
Diretoria de Graduação e Educação Profissional  
Coordenação do Curso de Agronomia



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NA CULTURA DA SOJA PELO TRATAMENTO COM PRODUTOS A BASE DE FOSFITOS, ACIBENZOLAR-S- METIL EM ASSOCIAÇÃO COM FUNGICIDAS

por

**ADRIANO LEWANDOWSKI**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ou esta Monografia ou esta Dissertação foi apresentado em 02 de dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Prof. Orientador Dr. Sérgio Miguel Mazaro**  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

**Membro titular: Dr. Flávio Endrigo Cechim**  
IFPR – Quedas do Iguaçu

---

**Membro titular: Daniel Claudio Grigolo**  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

Responsável pelos Trabalhos de conclusão de curso: **Dra. Angélica Signor Mendes**

---

**Coordenador do Curso: Dr. Lucas da Silva Domingues**  
UTFPR – Dois Vizinhos

## AGRADECIMENTOS

Obrigado Senhor por tudo que me deste.

Obrigado a todos que ajudaram de alguma forma na execução deste trabalho, e que não me lembrei de mencioná-los, fica aqui o meu sincero agradecimento.

Obrigado ao Professor Sérgio, que sempre me apoio, aconselhou, foi muito mais que um orientador foi um amigo, e um pai em minha graduação, minha eterna gratidão.

Obrigado ao Daniel, que esteve sempre trabalhando juntamente no experimento a campo.

Aos colegas Nean, Michely, Ivan, e Janaína, que muito me auxiliaram, meu muito obrigado.

Obrigado ao Edson que ajudou nos procedimentos finais.

Obrigado á minha família que sempre esteve ao meu lado, dando suporte nessa caminhada de graduação.

## RESUMO

LEWANDOWSKI, Adriano. **Indução de resistência na cultura da soja pelo tratamento com produtos a base de fosfitos, acibenzolar-s-metil em associação com fungicidas.** TCC (Curso de Bacharelado em Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

Existe uma crescente e visível preocupação quanto à resíduos presentes nos alimentos. Neste sentido, o uso de produtos alternativos no manejo de doenças vem ganhando destaque, além do que diversas moléculas de fungicidas utilizados na cultura da soja vêm perdendo sua eficiência. A utilização de fosfitos têm demonstrado potencial no controle de fitopatógenos em diversas culturas, no entanto na cultura da soja tais estudos são incipientes. O objetivo do trabalho foi testar o potencial na indução de resistência dos produtos: Ultra K, Ultra Mn, Cubo 700, a base de fosfitos de potássio, manganês e cobre, respectivamente, além de Acibenzolar-S-Metil (ASM), na cultura da soja, de forma isolada e associada aos fungicidas (azoxistrobina + ciproconazol e azoxistrobina+benzovindiflupir), observando o potencial dos produtos na ativação de rotas metabólicas associadas à indução de resistência e sua relação com o comportamento de doenças. O experimento foi desenvolvido durante o ano agrícola 2015/16, na estação experimental da UTFPR – Campus Dois Vizinhos, no delineamento blocos ao acaso, com três repetições, com parcelas de 3,6m<sup>2</sup> úteis, a cultivar utilizada foi Nidera NA5909RG. Avaliou-se severidade de doenças e a atividade das enzimas relacionadas à patogenicidade (PRPs), sendo elas: fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase. Os resultados demonstraram que todos os fosfitos e o ASM, quando associados com fungicidas apresentaram eficiente controle de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e mildio (*Peronospora manshurica*), com menor Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), em comparação com a testemunha, por outro lado, quando utilizados de forma isolada não demonstram potencial de controle dessas doenças. Todos os produtos avaliados apresentaram potencial de ativar as enzimas FAL,  $\beta$ -1,3 glucanase, bem como o Ultra Mn também ativou a enzima quitinase. Os resultados demonstraram ainda que tal ativação possui comportamento distinto quanto ao tempo de ativação após a aplicação.

**Palavras chave:** PRPs. *Glycine max*. Indutores Abióticos. Fosfitos

## ABSTRACT

LEWANDOWSKI, Adriano. **Induction of resistance in soybean (*Glycine max*) by treatment with the phosphite product base, acibenzolar-s-methyl and association with fungicides.** TCC (B.Sc. in Agronomy). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

There is a growing and visible concern about the residues present in food. In this sense, the use of alternative products in the management of diseases has been gaining prominence, in addition to which several fungicide molecules used at the soybean crop have lost their efficiency. The use of phosphites has shown potential at control of phytopathogens at many crops, however at the soybean crop such studies are incipient. The objective of the work was to test the potential at the induction of resistance of the products: Ultra K, Ultra Mn, Cubo 700, based on potassium phosphites, manganese and copper, respectively, in addition to Acibenzolar-s-methyl (ASM) at the soybean crop, in order to isolate and associated with fungicides (Azoxystrobin + Cyproconazole) and (Azoxystrobin + Benzovindiflupir). Observing the potential of the products in the metabolic routes activation associated with the induction of resistance and its relation with the behavior of diseases. The experiment was developed during the 2015/16 agricultural year, at the UTFPR experimental station - Dois Vizinhos Campus, with the randomized block design, with three repetitions, with 3,6m<sup>2</sup> useful portion, the cultivar used was Nidera NA5909RG. The severity of diseases and the activity of pathogenicity-related enzymes (PRPs) were evaluated, which are: Phenylalanine ammonia-lyase (FAL), chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. The results showed that all phosphites and ASM, when associated with fungicides, showed an efficient control of Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mildew (*Peronospora manshurica*), with a lower area under the disease progression curve (AACPD), in comparison with the control, on the other hand, when used alone do not demonstrate potential control of these diseases. All evaluated products had potential to activate FAL,  $\beta$ -1,3-glucanase enzymes, as well as Ultra Mn also activated the enzyme chitinase. The results also demonstrated that such activation has a distinct behavior regarding activation time after application.

**Keywords:** PRPs. *Glycine max*. Abiotic Inductors. Phosphites.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA .....	11
3.2 DOENÇAS: FERRUGEM E MÍLDIO, FREQUÊNCIA E IMPORTÂNCIA	12
3.2.1 Ferrugem asiática .....	12
3.2.3 Mildio .....	15
3.3 O USO DE FUNGICIDAS NO MANEJO DE DOENÇAS DA SOJA .....	17
3.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS À PATÓGENOS.....	18
3.5 FOSFITOS.....	19
3.6 ACIBENZOLAR-S METIL .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO.....	22
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS .....	23
4.3 IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO.....	27
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	28
4.4.1 Determinação da atividade enzimática de Fenilalanina amônia-liase (FAL) .....	29

4.4.2 Determinação de proteínas .....	29
4.4.3 Determinação da atividade enzimática de Quitinase .....	30
4.4.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -1,3 glucanase.....	30
4.5. ANÁLISE DE DADOS.....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
5.1 PRIMEIRA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	36
5.2 SEGUNDA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	39
5.3 TERCEIRA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	40
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi a cultura que mais cresceu nas últimas três décadas no Brasil, correspondendo a 49% da área plantada em grãos no país (MAPA, 2016).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja sempre estiveram associados aos avanços científicos, tecnológicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo (EMBRAPA, 2004).

Porém, devido ao fato de se tratar em muitas regiões de um monocultivo em larga escala, juntamente cresceram os fatores que comprometem a produção, dentre eles pode-se citar as doenças. Já foram identificadas várias doenças que afetam a cultura, e algumas são potencialmente danosas ao ponto de causarem 100% de perdas na cultura, com destaque para a ferrugem “asiática” da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow), bem como uma gama de outras doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, como a Antracnose (*Colletotrichum truncatum*); Crestamento foliar (*Cercospora Kikuchii*); Mancha parda (*Septoria glycines*); Crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycineae*); Mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus* – SMV); Nematóide de cisto (*Heterodera glycines*) (HENNING et al., 2014).

No momento, basicamente existem moléculas de alguns grupos de ação, como as estrobirulinas, triazóis, carboxamidas, benzimidazóis, que podem ser associadas ou não, capazes de controlar a Ferrugem Asiática da Soja (FAS), e outras doenças, em virtude de serem constantemente aplicadas as mesmas moléculas para controle de doenças, é gerada uma maior pressão de seleção sobre os patógenos, provocando uma perda de eficiência de moléculas.

A utilização de manejos alternativos pode ser uma maneira de auxiliar no manejo de doenças da soja, se tornando uma ferramenta a disposição do agricultor. Entre estes, pode ser citado a utilização de indutores de resistência, que tem a capacidade de ativar mecanismos de defesa inerente as plantas. Existem alguns produtos como o Acibenzolar-S-Metil, registrado como Bion, além de outros como Messenger, Oryzmate, que já vem sendo usados e pesquisados em diversas culturas.

Ainda existe a preocupação em relação aos agroquímicos quanto à contaminação do meio ambiente e alimentos, refletindo de forma direta na qualidade de vida da população (PASCHOLATI et. al, 2014)

Muitas pesquisas vêm buscando novas soluções para manejar de forma alternativa patossistemas de diversas culturas, usando produtos menos tóxicos se comparados aos métodos clássicos de controle de doenças. O controle alternativo ou integrado vem demonstrando grandes avanços. A indução de resistência em plantas a patógenos é compreendida como um método de controle alternativo, e pode ser conceituada como um processo de ativação de mecanismos latentes, que estão presentes nas plantas (PASCHOLATI et al, 2014).

Além dos produtos antes citados, a utilização de outros produtos, como os a base de fosfitos, já vem sendo estudados em diversas culturas, demonstrando potencial no controle de doenças, no entanto, sua relação com a ativação de enzimas relacionadas a patogenicidade na cultura da soja ainda apresenta carência de informações.

Esses indutores ativam rotas metabólicas de defesa vegetal, entre elas a rota dos fenilpropanóides, com ativação da enzima fenilalanina amônia-liase, para produção de fitoalexinas e compostos tóxicos aos patógenos. Existe ainda uma rota de grande importância, que é a de ativação de enzimas hidrolíticas como as quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, que hidrolisam a parede celular dos fungos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos produtos a base de fosfitos como indutores de resistência na cultura da soja, e sua relação com o comportamento de doenças.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar o potencial na indução de resistência dos produtos Ultra K (produto a base de fosfito de potássio), Ultra Mn (produto a base de fosfito de manganês), Cubo 700 (produto a base de fosfito de cobre), comparativamente com o Acibenzolar S Metil), sendo os produtos associados a fungicidas indicados para a cultura da soja.

Observar o potencial da ativação de rotas metabólicas associadas à indução de resistência, sendo a FAL (fenilalanina amônia-liase), quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases.

Avaliar sua relação com o comportamento de doenças na cultura por meio da avaliação de severidade de Ferrugem Asiática da soja e Míldio.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA

O Brasil, na safra 2013/14 foi o segundo maior produtor de soja em nível mundial, com uma produção de 85,507 milhões de toneladas, em uma área plantada de 30,135 milhões de hectares, e produtividade média de 2.842 kg.ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA SOJA; 2015).

Para o ano safra de 2014/15 os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), mostraram que a produção total do Brasil foi de 96.228 milhões de toneladas, com uma produtividade média de 2.998 kg.ha<sup>-1</sup>, no ano safra anterior (2013/14), a produtividade foi de 2.854 kg.ha<sup>-1</sup>. Porém, segundo o décimo levantamento da safra 2015/16 a produtividade média cai, a estimativa é que ela seja de 2.876 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB; 2016).

Uma das razões apontadas para a queda da produtividade foi à pressão de doenças, principalmente a ferrugem asiática, observada em todas as regiões produtoras (CONAB; 2016).

O Estado do Paraná foi o segundo maior produtor do País com estimativa de produção de 17,2 milhões de toneladas de soja na safra 2014/15, existindo uma seqüência de fatores que contribuíram para esse aumento, um deles é o aumento da área que na safra 2013/14 foi de 4,901 milhões de hectares, para 5,074 milhões de hectares na safra 2014/15, e as condições ambientais propícias. A produtividade passou de 2.976 kg/ha na safra 2013/14, para 3.327 kg/ha na safra 2014/15 (DERAL, 2015).

Concomitante a produção, ocorreu o aumento da venda de defensivos agrícolas, que servem de suporte a produtividade. Sendo que a venda de fungicidas, em comparação a outros defensivos agrícolas, foi a que mais cresceu no ano de 2014, atingindo crescimento de 12,1%, o volume comercializado totalizou US\$ 2,907 bilhões, sendo que, a principal doença que contribuiu para este aumento do uso dos fungicidas, foi a ferrugem asiática (SINDIVEG; 2015).

Porém na safra 2015/16 houve uma retração de 1,3% na produção e de 5,3% na produtividade de soja no Estado do Paraná, no Brasil como um todo ocorreu de 0,7% de queda, porém a área plantada aumentou (CONAB, 2016).

### 3.2 DOENÇAS: FERRUGEM E MÍLDIO, FREQUÊNCIA E IMPORTÂNCIA

Em 1986, a literatura afirmava que a soja poderia produzir até 4.000 kg.ha<sup>-1</sup> (YORINORI, 1986). No ano 2000 ensaios de campo conseguem chegar a 5.330 kg.ha<sup>-1</sup> (PIRES; J.F.L., et al., 2000).

No entanto uma série de fatores ligados às condições de solo, fatores climáticos, e outros agentes comprometem a produção. Dentre eles estão as doenças, que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. No Brasil cerca de 40 doenças já foram relatadas (identificadas), em nível mundial são mais de 100 doenças relatadas (HENNING, 2009).

As principais doenças, por se tratarem daquelas que apresentam maiores problemas fitossanitários com controle são: ferrugem asiática, crestamento de cercospora, septoriose, mofo branco, oídio, míldio, dentre outras (HENNING et al., 2014).

É de grande importância conhecer os problemas fitossanitários da cultura, e saber como manejá-los, pois somente um correto manejo traz resultados satisfatórios de sanidade e produtividade da cultura.

#### 3.2.1 Ferrugem asiática

Com o surgimento da Ferrugem “Asiática” da Soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow, os cuidados com a cultura começaram a ser mais exigentes, devido ao grande potencial de danos apresentados pela doença.

Relatada no Brasil ao final da safra de 2001, causando perdas severas nas safras seguintes, a Ferrugem asiática da soja passou a ser considerada uma doença de grande importância, devido a sua rapidez de infecção, facilidade de dispersão e promoção da desfolha acelerada das plantas. A partir de então começaram a surgir pesquisas mais aplicadas para entender a biologia e o controle da doença (YORINORI; JUNIOR; LAZZAROTTO; 2004).

A primeira alternativa a ser buscada em caráter emergencial foi a utilização de fungicidas à base de triázóis e estrobirulinas para seu controle. Em 2004 os pesquisadores já anunciavam o fato de que, o monocultivo da soja e o uso intensivo de controle químico ao longo de safras, poderiam trazer consequências sérias ao meio ambiente, e rendimento de produção da cultura, pelo agravamento de novas doenças até então desconhecidas ou pouco estudadas, resultando no desenvolvimento de tolerância do fungo da ferrugem aos fungicidas utilizados (YORINORI; JUNIOR; LAZZAROTTO; 2004).

A importância da ferrugem asiática pode ser avaliada pela sua rápida expansão e pelo montante de perdas que tem causado (YORINORI et al., 2003; YORINORI, 2004). Já na safra de 2001/02, a doença tinha se espalhado por cerca de 60% do território nacional.

O total de perdas de grãos atribuídas à ferrugem, no Brasil, no período de 2001/02 a 2003/04 atingiu mais de 8,5 milhões de toneladas ou o equivalente a US\$ 2,06 bilhões. (YORINORI; JUNIOR; LAZZAROTTO; 2004).

A principal medida de controle indicada ainda é mediada no uso de fungicidas (HARTMAN et al., 2005). Existe também o uso de cultivares tolerantes ao fungo, que oferecerem dificuldade à esporulação, a empresa que desenvolve estas cultivares, indica que o manejo da ferrugem asiática deve ser realizado com a aplicação de fungicidas, pois os materiais apenas dificultam a expansão da doença.

É muito importante conhecer bem a doença (FIGURA 1), sua detecção precoce propicia maiores níveis de controle. Os sintomas iniciais são caracterizados por pequenas lesões foliares, com coloração castanha a marron-escuro. Com o progresso da doença as urédias se abrem expelindo os esporos hialinos (uredósporos), sendo facilmente transportados pelo vento (HENNING et al., 2014).

A infecção ocorre em ambientes com temperatura entre 18 e 26,5 °C e elevadas umidades relativas (75 a 80%). Ambientes com períodos prolongados de molhamento foliar favorecem o progresso da doença (HENNING et al., 2014).

A EMBRAPA realiza ensaios cooperativos todo ano agrícola, em diferentes locais representativos na produção de soja, a fim de avaliar a eficiência dos fungicidas para o controle da ferrugem asiática.

Os resultados vêm demonstrando que os fungicidas formulados a partir de moléculas do grupo químico dos inibidores da quinona oxidase (Qol - picoxistrobina), também conhecidos como estrobirulinas, associadas ao grupo dos inibidores da succinato desidrogenase (SDHI – benzovindiflupir) , obtiveram resultados com maiores níveis de controle da ferrugem – asiática (GODOY. C.V et al., 2016).

Porém o percentual de controle vem caindo, isso é perceptível na comparação das últimas safras, quando na safra 2013/14 os percentuais de controle chegavam a 85%, na safra de 2014/15 o nível de controle cai para 82%, mas é na última safra sumarizada (2015/16) que se percebe uma queda mais expressiva, baixando o nível de controle para 76%. Se compararmos as três últimas safras houve uma queda acumulada de 11 pontos percentuais no nível de controle (GODOY. C.V et al., 2014; GODOY. C.V et al., 2016).

A Embrapa reitera que os fungicidas representam uma das principais ferramentas de manejo, que devem estar associadas as outras como o plantio de cultivares de ciclo precoce, respeitar o período de vazio sanitário, eliminação de plantas vivas, o monitoramento da lavoura desde o início, utilização de cultivares que apresentem resistência, utilização de fungicidas de forma preventiva quando as condições se apresentem favoráveis ao desenvolvimento da doença(GODOY; C.V et al., 2016).



**Figura 1: Sintomas na folha, e aspecto visual de parcela atacada pelo patógeno**  
**Fonte: Henning et al.(2014) (A); O Autor (2016) (B)**

### 3.2.2 Mildio

O Míldio causado pelo fungo *Perenospora manshurica* (Naumov) Syd., é considerada uma doença secundária na cultura da soja, seu agente etiológico é um



parasita obrigatório, pelo fato que necessita do seu hospedeiro para sobreviver, se mantendo na planta viva ou sementes (KOWATA, L.S. et al., 2008).

A doença tem origem nas folhas unifolioladas e pode progredir para e atingir quase todas as folhas da planta. Seu sintoma é caracterizado pela presença de manchas verde claras de 3-5mm de diâmetro, evoluindo para manchas irregulares de tom amarelado na parte superior da folha, com a evolução da doença o tecido é necrosado. No verso da mancha amarelada aparecem estruturas de frutificação, que apresentam aspecto cotonoso, de coloração levemente rosada a cinza (HENNING. A. A. et al.,2014).

Os sintomas podem ser observados na Figura 2.

O patógeno é inoculado na cultura por sementes infectadas ou por ação do vento, que carrega os esporos. As condições climáticas para o desenvolvimento da doença são temperaturas entre 20 °C a 22 °C, e umidade elevada (HENNING. A. A. et al.,2014).

O Míldio, por ser considerada uma doença secundária, não apresenta muitas medidas de controle, há não ser preventivas, como o uso de sementes certificadas, e cultivares resistentes (REGGINATO, 2008).

O controle utilizado usualmente para a ferrugem asiática da soja não atinge o míldio, podendo levar ao surgimento de surtos da doença. Esta doença vinha ocorrendo com mais frequência no Sul do Brasil em 2008 (KOWATA, 2008). É uma doença que foi esquecida ao longo das safras, e hoje é muito pouco estudada, muitas vezes por ser menos prejudicial e agressiva que a ferrugem asiática da soja.

A limitada disponibilidade de informações no que se refere aos prejuízos causados pela doença, torna difícil a recomendação de controle que atenda aos produtores, (REGGINATO, 2008).

Sendo uma doença que ocorre nos estádios iniciais, representa uma interessante oportunidade para avaliação, porque familiariza o avaliador a escala diagramática e prepara para a detecção de ferrugem asiática da soja.



**Figura 2. Sintomas de míldio, manchas amareladas**  
**Fonte: Henning et al. (2014)**

### 3.3 O USO DE FUNGICIDAS PARA CONTROLE DE DOENÇAS DA SOJA

Atualmente mais de 100 fungicidas possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle da ferrugem asiática da soja. A utilização de fungicidas à base de triazóis e estrobirulinas de forma isolada vem se tornando menos efetiva (EMBRAPA, 2014). O único grupo novo de fungicidas que está sendo utilizado com maior eficiência, indicado principalmente para a ferrugem-asiática é do grupo das carboxamidas. Deste modo acaba sendo limitado o número de moléculas para uso no controle da ferrugem, levando a seleção de patógenos mais resistentes, o que é um processo natural de seleção.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) elaborou um relatório sobre resíduos, dentro do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em

Alimentos (PARA) 2009-2011, neste relatório foram observadas amostras com resíduos de triázóis em feijão. O uso excessivo de fungicidas sistêmicos, tanto em relação ao emprego de altas doses, como em número de aplicações tem aumentado à pressão de seleção, dando margem a seleção de indivíduos resistentes, que já estão presentes na população do fungo em baixa percentagem (ZAMBOLIN, 2010).

O aumento das restrições ao uso de pesticidas tem sido um reflexo de uma sociedade que cada vez mais se preocupa com a saúde pública e meio ambiente. Os EUA e a União Européia estão reduzindo o uso de pesticidas convencionais (DALIO et. al, 2012). Essas mudanças afetam o Brasil, um exemplo é a Instrução Normativa Conjunta nº 1, que proíbe aplicação de produtos fitossanitários à base de Fipronil, Imidacloprido, Tiametoxan na cultura do algodão e em culturas de inverno instaladas a menos de 300 metros do algodoeiro (MAPA; 2016;); o motivo é o impacto que esses produtos causam nas abelhas nativas.

Neste contexto nos últimos anos, se observa a busca de novos métodos para controle de doenças, que sejam menos agressivos ao meio ambiente e ao usuário, nele se encaixam os indutores de resistência que vêm sendo pesquisados em diversas culturas e para diversos patossistemas, partindo do princípio que as plantas têm um sistema de defesa que faz parte delas, como a defesa contra patógenos (JONES & DANGL, 2006).

### 3.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS À PATÓGENOS

As plantas em sua constituição apresentam barreiras contra a entrada de patógenos. Essas barreiras de resistência podem ser pré-formadas, quando já existem antes do contato com o patógeno (cutícula mais espessa, tricomas), e pós-formadas (enzimas hidrolíticas, fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio, pectina, lignina), estas se manifestam após a infecção do patógeno, gerando uma resposta de defesa do vegetal. Tais formas de defesa podem ser classificadas como compostos estruturais servem de barreira física, ou bioquímica, estes estimulam a síntese e liberação de compostos tóxicos, que funcionam de forma antagônica ao desenvolvimento dos patógeno (PASCHOLLATI; LEITE, 2004).

As barreiras de resistência podem ser estimuladas com a aplicação de indutores, que interferem nos processos tanto fisiológicos quanto bioquímicos das diversas espécies de plantas, sendo capazes de ativar a resistência contra um amplo espectro de patógenos (GÖRLACH et al., 1996).

As primeiras observações sobre indução de resistência são do século 19. O fenômeno foi relatado por Chester em 1933, mas os primeiros conceitos, e a verificação do fenômeno foram efetuados por Joseph Kuc e Barnes et al em 1959 (KUC, 2001).

No Brasil, os estudos iniciais envolvendo a indução de resistência foram realizados na década de 1970, pela Dra. Walkyria B. C. Moraes no Instituto Biológico de São Paulo. O seu trabalho foi focado na indução de resistência em cafeeiros contra *Hemileia vastatrix*. Os trabalhos eram realizados com o uso de diferentes agentes, como, *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis*, uredósporos inativados de *H. vastatrix*. (BONALDO; PASCHOLATI; ROMERO, 2003).

Hoje existem vários trabalhos sobre a utilização de indutores, tanto bióticos (base de seres vivos) quanto abióticos, como Ácido salicílico, ASM, silício, silicatos, dentre os abióticos estão os fosfitos, que merecem destaque por possuírem capacidade direta e indireta de controle de patógenos.

### 3.5 FOSFITOS

Os fosfitos são produtos a base de ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), foram desenvolvidos no período da Segunda Guerra Mundial, quando se objetivava encontrar produtos para substituir os fertilizantes fosforados. As propriedades antifúngicas dos fosfitos foram descobertas na década de 1970, quando foram realizados estudos com Fosetyl-Al sobre requeima de batata (*Phytophthora infestans*) (CARMONA & SAUTUA; 2011).

Os fosfitos ( $H_2PO_3^-$ ) são compostos a base de fósforo, tendo como precursor o ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ) que em reação com uma base, hidróxido de potássio (KOH), por exemplo, forma sais fosfato de potássio e fosfito, sendo o fosfito a forma reduzida da molécula de fosfato ( $HPO_4^{2-}$ ), possui o átomo de hidrogênio no lugar de

um dos átomos de oxigênio, conferindo maior reatividade a molécula (NOJOSA, RESENDE & RESENDE; 2005).

Os fosfitos ( $\text{PO}_3^{-3}$ ) possuem um oxigênio a menos que os íons fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), o que confere a molécula uma maior solubilidade em água, sendo absorvida de 3 a 6 horas após seu contato com a planta (NOJOSA, 2005).

As pesquisas relacionadas ao potencial dos fosfitos na ação contra doenças começaram na Austrália em 1983, para controle de podridão de raiz em abacate (*Phytophthora cinnamommi*) (BARRETO, 2008).

No contexto de atividade fungitóxica, seu modo de ação atua de forma direta contra o patógeno, inibindo o crescimento micelial, levando a ruptura das hifas, ou pelo modo de ação indireto, que está relacionado a o estímulo de mecanismos de defesa das plantas. Os principais mecanismos de defesa são, aumento na produção de PRPs, fitoalexinas, lignina, acúmulo de compostos fenólicos, produção de espécies reativas de oxigênio que induzem a reação de hipersensibilidade e formação de agregados citoplasmáticos ao redor das células infectadas (DALIO et al., 2012).

Os fosfitos tem sido pesquisados em fruticultura, com respostas positivas, Brackmann et al (2004) utilizaram fosfito de potássio, associado a  $\text{CaCl}_2$ , para controle de podridões em pós-colheita em maçãs “Fuji”, e observaram controle satisfatório, recomendando a possibilidade de substituição do fungicida Iprodione, os dois tratamentos apresentaram diâmetro de lesões iguais. Foram observados controle de *Plasmopara viticola* na videira, *Penicillium expansum* em maçã (SÔNEGO & GARRIDO., 2003; Blum et al., 2004).

Em culturas anuais como o feijão (*Phaseolus vulgaris L.*), Gadaga (2009) observou o efeito sobre antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), neste ensaio foram obtidos resultados positivos, com menores severidades da doença e incremento na produtividade, ressaltando destaque nos fosfitos de potássio, zinco e manganês.

Na soja, existem trabalhos mais recentes avaliando o uso de fosfito de potássio, e sua influência na severidade da ferrugem asiática da soja, com fontes de fosfito e acibenzolar-S-metílico para o controle de doenças foliares (MENEGETTI; R.C., et al., 2010; SILVA; O.C., et al., 2013).

Para Hardy et al. (2001) os fosfitos possuem variação que deve ser considerada em relação entre as mais diversas espécies de plantas, época e frequência de aplicação.

Existem produtos comercializados a base de Fosfito. Como exemplo o Phytogard que é vendido no Brasil como fertilizante foliar à base de fosfito de potássio, que possui ação na formação de fitoalexinas em plantas, aumentando a resistência contra a infecção de patógenos, além de contribuir com a tolerância vegetal. É um produto considerado como não fitotóxico e de baixa toxicidade aos mamíferos (DALIO et al., 2012).

As fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizados pelas plantas, estes ficam acumulados em suas células, quando o agente infeccioso entra em contato com estes compostos tóxicos, acaba morrendo, trata-se de uma resposta à infecção microbiana, sendo uma maneira da planta se proteger contra a invasão (PASCHOLATTI & LEITE).

### 3.6 ACIBENZOLAR-S-METIL

O Bion é um produto que possui registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Registro nº 005801), como ativador de plantas (ADAPAR, 2016).

Por se tratar de um ativador de plantas ele se mostra eficiente em diversas culturas, controlando várias doenças, para diversos tipos de patógenos, isso lhe confere amplo espectro de ação como indutor de resistência (FERNANDES, 2009).

O Acibenzolar-S-methyl (ASM) é um elicitor sintético análogo ao Ácido Salicílico (AS), ou seja, atua na ativação de expressão dos mesmos genes que o AS, estes genes são relacionados à Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (STICHER et al., 1997; AGNELLI, 2011).

Duarte et al (2009) compararam ASM ao fungicida mancozeb, observando um desempenho semelhante dos dois produtos, sendo que o mancozeb atua de forma preventiva a infecção da ferrugem asiática. Dallagnol et al. (2006) e Santos et al. (2011), demonstraram aumento da eficiência de fungicidas associados ao ASM para controle da doença.

As comparações entre os tratamentos com fungicidas associados ao Bion e aqueles em que os fungicidas foram associadas aos fosfitos, podem servir como um parâmetro de avaliação no momento dos resultados de comportamento das respostas enzimáticas de Proteínas Relacionadas a Patogenicidade (PRPs).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO**

O experimento foi conduzido na Estação Experimental do Campus Dois Vizinhos – PR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A área experimental está demonstrada na figura abaixo (Figura 3), e suas coordenadas aproximadas são 25°42'12" de latitude S e longitude de 53°05'43" W-GR, à 530 metros acima do nível do mar. O clima da região segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (1936) é caracterizado como Cfa (Subtropical úmido mesotérmico), sem estação seca definida. Os solos locais predominantes são das classes, Latossolo e Nitossolo (ALVARES et al., 2013).



**Figura 3: Imagem da condução do experimento, UTFPR – Dois Vizinhos. Fonte: Autor (2015).**

#### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O experimento foi conduzido em Delineamento Blocos ao Acaso (DBA), com 12 tratamentos e três repetições, totalizando 36 unidades experimentais. Cada unidade experimental constou de 5 linhas de cultivo de soja espaçadas à 0,45 metros, e 5 metros de comprimento cada, sendo avaliadas as três linhas centrais, também desprezando-se meio metro de cada extremidade resultando em uma área útil de 5,4m<sup>2</sup> por parcela. Os Tratamentos utilizados e as épocas de aplicações estão dispostos na **Tabela 1**.

A primeira aplicação dos produtos foi realizada na fase vegetativa V4 (terceiro trifólio totalmente expandido), onde foi aplicado herbicida a base de glifosato em todas as parcelas, sendo que nos tratamentos T3 e T10 foi adicionado o Ultra Mn10, conforme a Tabela 1.

Na segunda e na terceira aplicação foram utilizadas as associações de fungicidas e indutores, sendo essas realizadas em R1 e R4, respectivamente.

As características destas fases são: R1 (com uma flor ao menos no caule principal); a segunda em R4 (Vagem completamente desenvolvida com 2cm e em um dos quatro últimos nós) e a quarta e última aplicação em R5.5 (Granação de



76% a 100%). Nessa última aplicação, aonde haviam associações (fungicida mais indutor), foram apenas utilizados fungicidas e nas parcelas aonde antes havia sido utilizado o produto de maneira isolada, se manteve apenas o indutor.

Na segunda aplicação nos tratamentos T1 não foram utilizados fungicidas, no tratamento T2, foram utilizados apenas fungicidas em três aplicações sequências respeitando as fases acima citadas. No tratamento T3 foi utilizado o Ultra Mn na primeira aplicação e nas outras os mesmos tratamentos de T2.

Nos tratamentos T4, T5, T11, foi utilizado herbicida para o manejo de ervas daninhas, e nas outras aplicações se utilizou Cubo, Ultra K, Bion, respectivamente.

Nos tratamentos T6 e T7 o Cubo foi associado aos fungicidas sendo aplicado uma e duas vezes respectivamente.

Nos tratamentos T8 e T9 o Ultra K foi associado aos fungicidas, sendo aplicado uma e duas vezes respectivamente.

No tratamento T10 todos os produtos a base de fosfitos foram utilizados em associação com os defensivos em aplicações sequências até a terceira aplicação.

No tratamento T12 o ASM foi associado ao fungicida.

**Tabela 1.** Descrição dos tratamentos com as respectivas doses dos produtos comerciais e estágio fenológico para aplicação na cultura da soja. UTFPR - Dois Vizinhos, 2016.

<b>Tratamentos</b>	<b>Dose (L.ha<sup>-1</sup>/ Kg.ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Aplicação</b>
<b>T1</b> - Testemunha (Glifosato)	2	V4
<b>T2</b> - Glifosato/ Piori Xtra+Nimbus/Elatus+Nimbus/Prior i Xtra+Nimbus	2/ 0,30 + 0,60 / 0,20* + 0,60 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T3</b> - Glifosato+Ultra Mn10/Piori Xtra+Nimbus/ Elatus +Nimbus/Piori Xtra + Nimbus	2 + 0,50 / 0,30 + 0,60 / 0,20* + 0,60 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T4</b> - Glifosato/ Cubo 700/ Cubo 700/ Cubo 700	2 / 0,40 / 0,40 / 0,40	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T5</b> - Glifosato/ Ultra K10/ Ultra K10/ Ultra K10	2 / 0,40 / 0,40 / 0,40	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T6</b> - Glifosato/ Piori Xtra + Nimbus + Cubo 700/ Elatus +Nimbus/Piori Xtra + Nimbus	2 / 0,30 + 0,60 + 0,40 / 0,20* + 0,60 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T7</b> - Glifosato/ Piori Xtra + Nimbus + Cubo 700/ Elatus +Nimbus+ Cubo 700/Piori Xtra + Nimbus	2 / 0,30 + 0,60 + 0,40 / 0,20* + 0,60 + 0,40 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T8</b> - Glifosato/ Piori Xtra + Nimbus + Ultra K10/ Elatus +Nimbus/Piori Xtra + Nimbus	2 / 0,30 + 0,60 + 0,40 / 0,20* + 0,60 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T9</b> - Glifosato/ Piori Xtra + Nimbus + Ultra K10/ Elatus +Nimbus+ Ultra K10/Piori Xtra + Nimbus	2 / 0,30 + 0,60 + 0,40 / 0,20* + 0,60 + 0,40 / 0,30 + 0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T10</b> - Glifosato + Ultra Mn10/ Piori Xtra + Nimbus + Cubo 700/ Elatus + Nimbus + Ultra K10/ Piori Xtra + Nimbus	2+0,5 / 0,30+0,60+0,40/ 0,20+0,60+0,40/ 0,30+0,60	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T11</b> - Glifosato / Bion/ Bion/ Bion	2,00 / 0,05 / 0,05 / 0,05	V4 / R1 / R4 / R5.5
<b>T12</b> - Glifosato/ Piori Xtra+Nimbus+Bion/ Elatus+Nimbus+Bion/ Piori Xtra + Nimbus	2,00 + 0,50 / 0,30 + 0,60 + 0,05 / 0,20* + 0,60 + 0,05/ 0,30 + 0,6	V4 / R1 / R4 / R5.5

\*Dose em kg/ha<sup>-1</sup>

As aplicações foram realizadas com o auxílio de um pulverizador costal propellido por CO<sub>2</sub> comprimido, com barra de aplicação apresentando quatro pontas de jato tipo cônico vazio espaçadas entre si a 0,5m, da marca Magnojet modelo Mag Cone Vazio, codificação da ponta Mag2, com pressão de serviço constante de 30

lbf/pol<sup>2</sup>, e vazão equivalente a 250 l. ha<sup>-1</sup>(Figura 4). As aplicações foram preferencialmente realizadas com melhores condições de temperatura e umidade, e os dados de temperatura e umidade do momento das aplicações foram obtidos da estação meteorológica automática presente no campus Dois Vizinhos (Tabela 2).

**Tabela 2. Dados de umidade relativa do ar, temperatura, de acordo com a estação meteorológica automática do campus nos momentos da aplicação**

Data da aplicação	Horário	Umidade Relativa do ar*	Temperatura (°C)*
04/11/2015	16:00	74	23°
13/11/2015	15:00	62	30°
17/12/2015	17:30	62	29°
12/01/2016	10:28	89	24°

\*Dados obtidos da estação meteorológica automática de Dois Vizinhos, código A843

Fonte: Inmet



**Figura 4: Equipamento pulverizador propelido a CO<sub>2</sub>, equipado de 4 pontas de jato cônico espaçadas a 0,5 metros.**

Fonte: O autor (2016)

### 4.3 IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO

O experimento foi implantado no dia 07 de outubro 2015, em área previamente dessecada com glifosato (3 L. ha<sup>-1</sup>). A Cultivar de soja utilizada, foi Nidera NA 5909 RG (grupo de maturação 5.9), por ser utilizada na região, e pelo material apresentar estabilidade em diferentes regiões, e pela disponibilidade de sementes.

A população utilizada foi de 308 mil plantas hectare, com distribuição de quatorze sementes por metro linear, foram fornecidos no sulco de plantio 350 kg.ha<sup>-1</sup> da fórmula de NPK 02-24-18 (Nitrogênio, Fósforo, Potássio), resultando em 7 kg.ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio, 84 kg.ha<sup>-1</sup> de Fósforo e 63 kg.ha<sup>-1</sup> de Potássio. O espaçamento entre linhas utilizado foi de 45 centímetros.

Para análise de severidade de doenças foram marcadas quatro plantas por parcela, com o auxílio de uma linha vermelha, amarrada no trifólio, sendo instalada a marca em um trifólio do terço inferior, um do médio e um do superior de cada uma das plantas.

Foram acompanhadas a evolução de duas doenças, a Ferrugem Asiática da Soja e o míldio, as avaliações de severidade foram efetuadas a cada 7 e 14 dias respectivamente, devido ao comportamento observado das doenças.

A avaliação da severidade da ferrugem asiática foi realizada com o auxílio da escala visual de Godoy (2006) (Anexo I) os levantamentos iniciaram a partir do dia 30 de dezembro de 2015 até o dia 28 de janeiro de 2016 (5 avaliações).

Para o míldio foram realizadas avaliações de severidade a cada 14 dias com início nas avaliações em 14 de dezembro de 2015, totalizando três avaliações, as avaliações foram realizadas de acordo com a escala de severidade de Kowata et al.(2008) de por meio da mesma amostra de quatro plantas marcadas dentro da área útil da parcela (Anexo II).

Com base nos dados de severidade obtidos, foi obtida a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença foi obtida a partir da severidade da doença, com a seguinte equação:  $AACPD = \Sigma[(I_i + I_{i+1})/2.(T_{i+1}-T_i)]$ , onde  $I_i$  = incidência na época da avaliação  $i$ , e  $T_i$  = Intervalo entre dias na época de avaliação  $i$ , o resultado foi expresso em percentual de folhas atacadas (MAZARO et al., 2012).

Para o controle de pragas, foram utilizados inseticidas recomendados para a cultura.

#### 4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O material vegetal para análises bioquímicas de Proteínas, Fal, Quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases foi coletado em zero (antes da aplicação) em 24, 96 e 168 horas após a aplicação dos tratamentos, segundo Steiner e Schönbeck (1995), a expressão de indução, pode não ser imediata, para que a planta expresse a resistência, pode demorar alguns dias, e até mais de uma semana. Este material vegetal foi coletado da parte superior das plantas, sendo retirados trifólios totalmente expandidos e, preferencialmente sem presença de danos visíveis provocados por insetos ou outras fontes de injúrias, de modo a evitar possíveis interferências nas respostas enzimáticas.

O número de trifólios coletados foi de cinco a sete, destacados da planta com auxílio de uma tesoura, sendo identificados, e acondicionados em uma caixa de isopor, com bolsa de gelo artificial reutilizável, a fim de evitar desidratação dos tecidos. Em seguida o material vegetal foi embrulhado em papel alumínio, identificado e armazenado em refrigeração (-1 a -4°C) (FIGURA 5). Para as análises bioquímicas foram pesadas amostras de 0,6-0,8 gramas de tecido vegetal, o valor do peso foi anotado a fim de utilizá-lo para as relações de determinações enzimáticas.

Para obtenção do extrato enzimático as amostras foram maceradas em almofariz contendo 0,5g de pérola de vidro, 0,3g de Dowex 1-X8, e 0,3g de Polivinilpirrolidona, e tampão Borato de Sódio pH 8,8. Após os extratos foram centrifugados a 20.000g a 4°C por 30 minutos, sendo retirado em torno de 3 ml de sobrenadante, reservando em refrigeração para a posterior quantificação de proteínas totais, Fal, Quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases.



**Figura 5. Acondicionamento das amostras em refrigerador**  
**Fonte: O autor (2016)**

#### 4.4.1 Determinação da atividade enzimática de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A determinação da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL), foi realizado conforme a metodologia conforme Kuhn (2007), por meio da quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina. A leitura é realizada em espectrofotometro de luz no comprimento de onda 290 nm, com utilização de cubeta de quartzo. Os resultados obtidos são expressos em atividade enzimática por grama de tecido fresco (UAbs/min/ mg. proteína)

#### 4.4.2 Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas totais foi efetuada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). O extrato enzimático é obtido do extrato previamente pronto, macerando-se este em almofariz com três ml de solução tampão Fosfato 0,2 Molar pH 7,5, acondicionado em tubos de ependorf devidamente identificados e

centrifugados a 14 000g / 10 min a 4°C. Posteriormente, são transferidos 0,04 ml do sobrenadante do extrato para tubos de ensaio com 0,46 ml de água destilada e 1 ml do reagente Bio-Rad diluído em água destilada na proporção 1:4 (uma parte de reagente, para quatro partes de água destilada). Em seguida foi feita a homogeneização em vortex e leitura em espectrofotômetro á 595 nanômetros para se obter os valores de absorbância, com cubeta de vidro. Os resultados são expressos em  $\text{mg g}^{-1}$ . tecido vegetal fresco.

#### 4.4.3 Determinação da atividade enzimática de Quitinase

Para a obtenção da atividade de quitinases, seguiu-se os procedimentos descritos por Wirth e Wolf (1992), com adequações, onde as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi utilizado na avaliação da atividade das enzimas.

A quitinase foi avaliada por meio da liberação de oligômeros solúveis de “chitin-azure”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta 5R -RBV (Sigma Aldrich®).

A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 550 nanômetros utilizando cubeta de vidro. Os resultados da atividade enzimática são expressos pela divisão da absorbância pela concentração protéica na mistura da reação sendo Unidade Enzimática por miligrama de proteína (U.E mg/proteína).

#### 4.4.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -1,3 glucanase

A metodologia utilizada na determinação da atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase foi desenvolvida por Wirth; Wolf (1990). Do extrato enzimático previamente preparado foram retirados 0,2 ml. Posteriormente após descongelar o extrato, em tubos de ensaio numerados, foram adicionados 0,2 ml de sobrenadante do extrato enzimático, 0,4 ml de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 0,2 ml de

substrato CM-Curdlan-RBB 4 mg/ml, levando para incubar em banho maria a 40°C por 1 hora. A interrupção da reação foi realizada com adição de 0,2 ml de HCl 2 N e resfriamento em banho de gelo por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 10.000g, para remoção do substrato insolúvel não hidrolisado. Em espectrofotômetro foram realizadas as leituras de absorvância em comprimento de onda de 600 nanômetros, com o uso de cubeta de vidro, os resultados são expressos em U.E/min./mg. proteína..

#### 4.5. ANÁLISE DE DADOS

Após a tabulação e compilação, o conjunto de dados de AACPD de ferrugem asiática e míldio foram submetidos ao teste de normalidade de dados, por Lilliefors, e a homogeneidade da variância por Bartlett, para posteriormente ser efetuada a análise de variância (ANOVA), os dados significativos foram comparados pelo teste de médias Scott Knot a nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados da Área Abaixo da Curva de Progresso do Míldio (AACPM), e da Área Abaixo da Curva de Progresso da Ferrugem (AACPF) foram transformados por qui-quadrado ( $X^2+K$ ). As atividades enzimáticas de Fal, Quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases foram trabalhadas no Microsoft Excel e inseridas as barras de erro. Foi utilizado o software estatístico GENES VS 2013 5.1 (CRUZ, C.D., 2006)

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com os dados de severidade foi construída a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para ferrugem e para o míldio. (Tabela 2)

Nos valores para AACPD para ferrugem, foram obtidos dois grupos de tratamentos, que se diferenciaram (Tabela 2).

É possível observar que os tratamentos T2, T3, T6, T7, T8, T9, T10, T12, não apresentaram diferença estatística na AACPD para a FAS, a nível de 5% de probabilidade, todos estes tratamentos continham três aplicações de fungicidas, a



primeira com azoxystrobina ( $60\text{g.i.a ha}^{-1}$ ) + ciproconazole ( $24\text{g.i.a ha}^{-1}$ ), a segunda com azoxystrobina ( $60\text{g.i.a ha}^{-1}$ ) + benzovindiflupir ( $30\text{g.i.a ha}^{-1}$ ), e a terceira intervenção novamente com azoxystrobina ( $60\text{g.i.a ha}^{-1}$ ) + ciproconazole ( $24\text{g.i.a ha}^{-1}$ ). Os tratamentos T3, T6, T7, T8, T9, T10, T12, se tratam das diversas associações do tratamento T2, com Ultra K, Ultra Mn e Cubo não apresentaram diferença significativa perante o efeito do tratamento T2.

Porém o tratamento T8 aonde os fungicidas foram associados ao Ultra K, em seguida o T10 (utilizado todos os produtos mais os dois fungicidas), obtiveram um valor menor na AACPD da ferrugem, mas não significativo estatisticamente (Tabela 2).

Silva et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes, testando a utilização de fontes de fosfito e ASM, em associação com fungicidas, no controle dos mesmos patossistemas na soja, não observando diferença de incremento na redução da severidade (%) de ferrugem asiática e míldio. Meneghetti et al. (2009), não observaram efeito positivo do fosfito de potássio no controle da ferrugem asiática.

Pode ter ocorrido um efeito de sinergismo entre os indutores associadas aos fungicidas, aonde o efeito dos fosfitos ou ASM, e dos fungicidas foi menor que o efeito da associação fungicida mais indutor, a exemplo de comparação pode-se usar os tratamentos referentes à severidade de míldio.

No T9, a associação de Ultra K com fungicidas, obteve 21,42 de AACPD, em comparação aos tratamentos T5 somente Ultra K com 80,71 de AACPD, e o T2 somente os fungicidas com 47 de AACPD. Foi observado que o T9 obteve um efeito melhor, com redução de cerca de 75% da AACPD em relação ao tratamento com somente o fosfito (T5), e redução em cerca de 45% da AACPD em relação ao fungicida (T2).

Para ferrugem asiática utilizando os mesmos tratamentos (T9, T2, T5), a associação de duas aplicações de Ultra K com fungicidas, foi inclusive estatisticamente diferente de T5, e obteve uma redução de cerca de 11% AACPD de ferrugem asiática.

Sônego e Garrido (2003), observaram um efeito sinérgico, quando misturaram fosfito de potássio com o Fungicida Equation ou Manzate, para controle de míldio da videira, aonde houve uma eficácia maior nesses tratamentos com mistura, do que nos produtos aplicados isoladamente.

Tabela 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para severidade de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), míldio (*Perenospora manshurica*), na cultura da soja Ufpr,2016.

TRATAMENTO	AACPD	
	FERRUGEM	MÍLDIO
1	1530, 85 a	153, 97 a
2	416, 58b	47, 64 c
3	297, 40b	35, 23 c
4	1365, 11 a	88, 38 b
5	1487, 48 a	80, 71 b
6	421, 85b	41, 60 c
7	356, 41b	19, 97 d
8	273, 16b	48, 41 c
9	366, 22b	21, 42 d
10	305, 85b	14, 04 d
11	1348, 51 a	80, 92 b
12	343, 60b	17, 19 d
<b>MÉDIA</b>	<b>709,41</b>	<b>54,12</b>
<b>CV(%)</b>	<b>19.46</b>	<b>14.44</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: O autor (2016)

Neste trabalho não foram avaliadas as correlações entre severidade de doença e produtividade, mas outros autores observaram correlações negativas elevadas entre as variáveis, severidade de doença e produtividade, na safra de 2005/06, ao estudarem a eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação (GODOY, C.V. *et al.*, 2009).

Oliveira et al. (2015) não observaram efeitos de incremento significativo na redução da severidade da ferrugem asiática, quando utilizaram fosfitos associados ao fungicida ciproconazol + azoxistrobina, ao avaliarem a produtividade constataram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com apenas fosfito de potássio e a testemunha, concordando com os resultados aqui encontrados para área abaixo da curva de doença nos tratamentos que receberam apenas os indutores.

Para o míldio igualmente, os tratamentos que continham os fungicidas associados aos indutores se mostraram superiores ao uso de indutores isolados, estes últimos não se diferenciaram da testemunha (Tabela 2).

De modo que, as menores severidades observadas para míldio estão nas associações de fungicidas mais fosfitos ou ASM, superando o tratamento aonde somente se utilizou o fungicida de forma isolada T2, porém não significativo ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2). Silva et al. (2011) observou superioridade no efeito da redução da severidade de míldio pelo uso dos fosfitos em relação ao ASM, o que não foi observado neste trabalho.

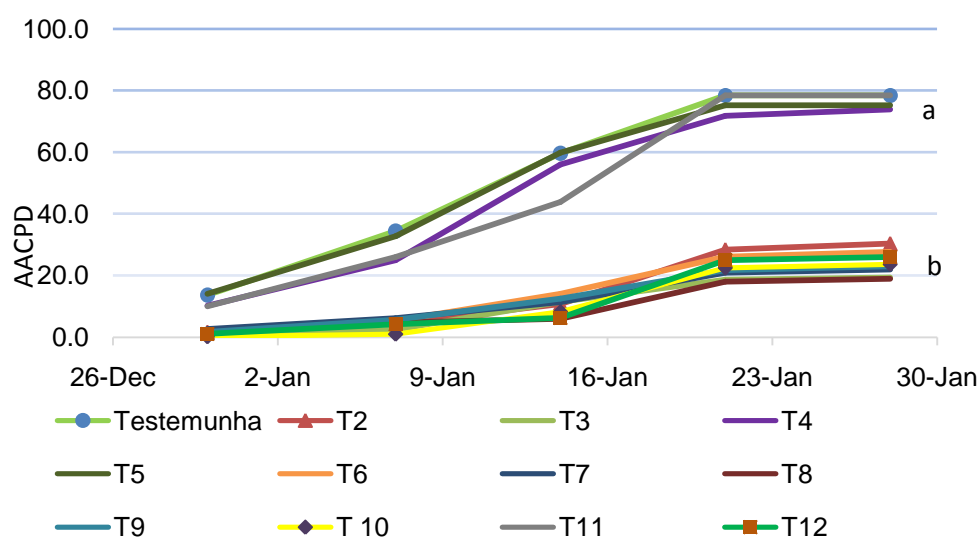
Outros autores, ao contrário do que foi até então exposto neste trabalho, conseguiram redução na AACPD do míldio, utilizando biomassa cítrica, obtendo diminuição da doença, conforme foi aumentada a dose até a concentração de 3ml de biomassa cítrica por litro de água aplicados, observando que esta concentração era suficiente para reduzir a severidade da doença. Porém para a ferrugem asiática, estes não relatam redução significativa da doença quando comparada a testemunha pulverizada com água (KUHN; PORTZ; STARGALIN, 2009).

Para avaliar o efeito indutor dos tratamentos, nas respostas de enzimas relacionadas a patogenicidade foram, de posse destes dados de AACPD da ferrugem asiática, e do míldio, selecionados quatro tratamentos que pudessem melhor representar o efeito de indução, foram escolhidos os tratamentos conforme TABELA 3, assim foi dado o prosseguimento das análises bioquímicas da Proteínas Relacionadas a Patogenicidade (PRPs) e FAL.

Os critérios para escolha foram, um tratamento que representa-se a testemunha absoluta, escolhendo o T1. Um tratamento que representa-se o efeito dos fungicidas na atividade enzimática (T2), de modo a fornecer a mesma base comparativa para os tratamentos aonde foram associados os fungicidas mais os indutores, de modo a viabilizar esta comparação entre fosfitos e ASM. Dois tratamentos que, pudessem melhor demonstrar o possível efeito aditivo promovido pelos indutores, aonde que além das menores AACPM e AACPF, ocorreu também a defesa vegetal, desta forma foram escolhidos os tratamentos T10 e T12 (Figura 6).

**Tabela 3.** Relação dos tratamentos utilizados para as análises, de proteínas totais, Fal, Quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases.

Tratamento	Dose (L/g ha <sup>-1</sup> )	Aplicação
T1. Testemunha (Glifosato)	2	V4
T2 Glifosato / Piori xtra+ Nimbus/ Elatus + Nimbus	2 / 0,3 +0,6 / 0,2 + 0,6	V4 / R1 / R4
T10. Glifosato + Ultra Mn10 / Piori xtra+Nimbus+Cubo700 / Elatus + Nimbus + Ultra K10/	2 + 0,5 / 0,3 + 0,6 + 0,40 / 0,20 + 0,60 + 0,40	V4 / R1 / R4
T12. Glifosato / Piorixtra + Nimbus + Bion/ Elatus + Nimbus +Bion	2 / 0,3+ 0,6 + 0,05 / 0,2 + 0,60 + 0,50	V4 / R1 / R4



**Figura 6.** Curva de Progresso da ferrugem asiática, comparativo entre os tratamentos T1 (testemunha), T2, T10, T12. Autor (2016)

## 5.1 PRIMEIRA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na primeira aplicação em V4 é possível observar, respostas enzimáticas, dos tratamentos T1 (Glifosato) e T10 (Ultra Mn + Glifosato), aonde é visualizado um efeito na ativação das enzimas FAL, Quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, no tratamento T10, sendo que o pico enzimático para a FAL ocorreu as 24 horas após o tratamento, para Quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases o pico de resposta enzimática ocorreu as 96 horas Figura 7.

Estes resultados demonstram o potencial do Ultra Mn, na ativação de rotas metabólicas de defesa vegetal. O tratamento T10 apresentou anteriormente na AACPD do Míldio a menor curva, e para a FAS a segunda menor, diferenciando-se da testemunha.

Schalleberger (2014) não observou diferença significativa entre a associação de fosfito de manganês mais o fungicida (azoxistrobina 200 g/L + ciproconazol 80 g/L), na redução da severidade de doenças entre tratamentos e testemunha, o que foi diferentemente observado aqui, aonde os tratamentos que continham Ultra Mn apresentaram diferença significativa comparada a testemunha, para AACPD de ferrugem e míldio.

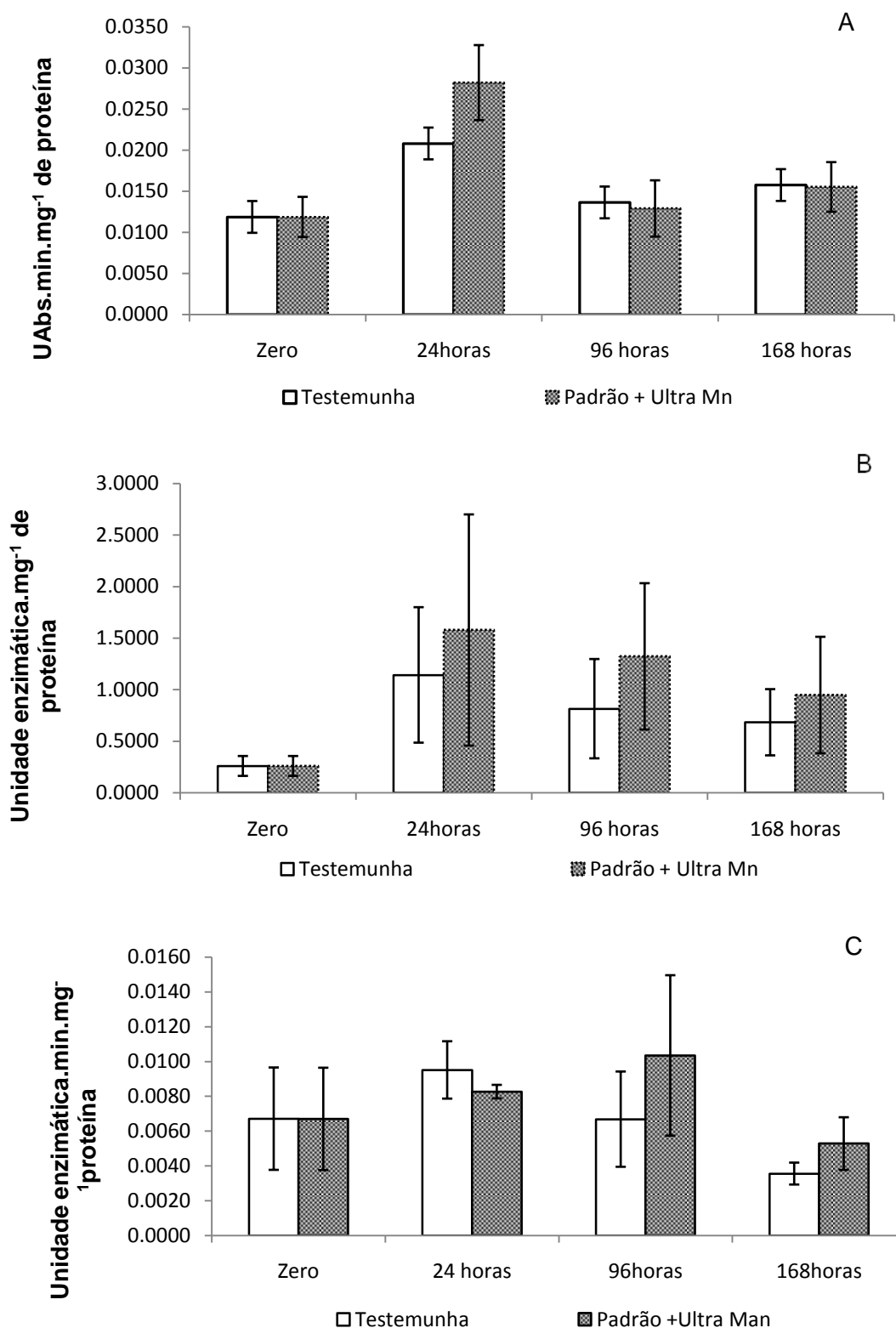
O tratamento T10, mostrou ativação para a atividade de Fal as 24 horas após aplicação, para quitinases também as 24 horas após aplicação, e para  $\beta$ -1,3 glucanases as 96 horas após a aplicação. Outros pesquisadores, testando o potencial de indução de resistência com Ácido Salicílico, observaram o aumento significativo da atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases a partir das 48 horas após aplicação de Ácido salicílico, perdurando quando avaliada a enzima as 96 horas após aplicação e 144 horas após aplicação (BORSATTI, F.C. et al., 2015).

A rota da enzima Fal é descrita pela ação da enzima sobre o aminoácido L-fenilalanina, formando ácido trans-cinamico e amônia (CAVALCANTI et al. 2005). A atuação da fenilalanina amônia-liase, encontra-se em um ponto de transição entre o metabolismo vegetal primário e secundário, a reação por ela catalisada esta ligada a formação de muitos compostos fenólicos, que podem ser tóxicos a patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Ela está relacionada como via biossintética dos fenilpropanoides (GUZZO, 2004). Sua maior atividade inicial, atingindo pico às 24 horas pode estar

relacionada há uma maior produção de compostos fenólicos e desencadeamento de uma série de reações bioquímicas ativadas nas plantas.

As relações entre resistência sistêmica e hidrolases, nestas enzimas estão inseridas as  $\beta$ -1,3 glucanases e as quitinases, sempre esteve baseada no fato de que, na parede celular de muitos fungos, estes são os maiores componentes, e que essas enzimas podem hidrolisar a parede celular desses patógenos (RODRIGUES; A.A.C et al., 2006)

De acordo com resultados obtidos por Cavalcanti et al. (2005), as respostas enzimáticas para quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, ocorrem nas primeiras horas após a aplicação de indutores de resistência.



**Figura 7: Atividade enzimática de Fal(A), Quitinases (B),  $\beta$ -1,3 Glucanases (C), em função dos tratamentos em zero, 24, 96 e 168 horas, comparando tratamento padrão (somente glifosato) com glifosato em associação a Ultra Mn®. 1ª aplicação. Tratamentos: T1 e T10. Barras na vertical indicam o erro padrão. UTFPR – Dois Vizinhos – PR, 2016. Fonte: Autor (2016).**

## 5.2 SEGUNDA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA

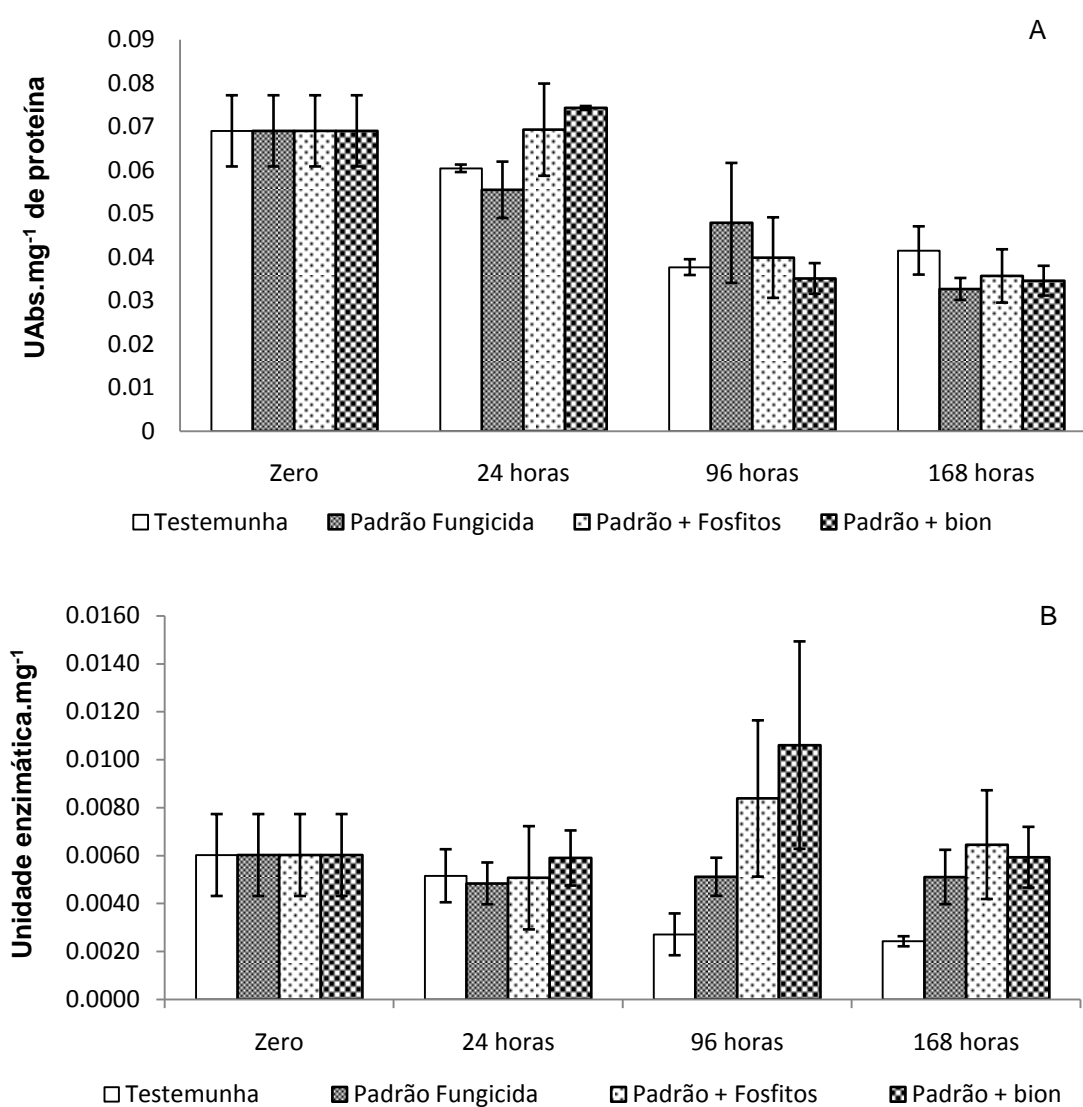
Para a segunda aplicação, realizada no estágio R1 da soja, foram comparadas as respostas enzimáticas de Fal, e  $\beta$ -1,3 glucanases dos tratamentos: Testemunha (T1); Somente Fungicidas (T2); Fungicidas mais fosfitos (T10); Fungicidas mais Bion (T12), nas coletas zero, 24, 96, 168 horas após aplicação. (Figura 8).

Para Fal, o pico de resposta novamente ocorreu as 24 horas após aplicação. O tratamento T12 (Bion associado aos fungicidas) obteve as melhores respostas enzimáticas apresentadas em Fal, as 24 horas após aplicação, seguido pelo tratamento T10 (Fosfitos associados aos fungicidas), porém não foi observado incremento em relação a coleta zero para o tratamento T10.

Na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases, foi observada uma resposta de elevação dos teores da enzima nos tecidos da planta, as 96 horas após aplicação, sendo que o tratamento T12 obteve um pico de resposta maior, seguido do tratamento com fosfitos T10 (Figura 8).

Em tomate desafiado pela bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, Cavalcanti et. al (2006), observaram o incremento de atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases as 36 horas após aplicação, chegando até 12 dias após aplicação, mas por vezes a resposta enzimática não foi significativa, isso em aplicações de ASM. Também afirmaram que o ASM possui capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro contra esta bactéria.





**Figura 8: Atividade enzimática de Fenilalanina amônia-ase (FAL) (A), β-1,3 Glucanase (B). TRATAMENTOS: T1, T2, T10, T12. 2ª aplicação. Barras na vertical indicam o erro padrão. UTFPR – Dois Vizinhos – PR, 2016. Fonte: Autor (2016).**

### 5.3 TERCEIRA APLICAÇÃO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na terceira aplicação as coletas procederam da mesma maneira sendo as zero, 24, 96, 168 horas após aplicação, novamente não foi notada resposta na atividade de quitinases.

Ao serem utilizados os valores de Fal e  $\beta$ -1,3 glucanases foram observados picos de resposta de Fal as 96 horas para aplicação de ASM e 168 horas para fosfitos não diferindo as respostas entre 96 e 168 horas após aplicação para o tratamento T10, conforme Figura 9.

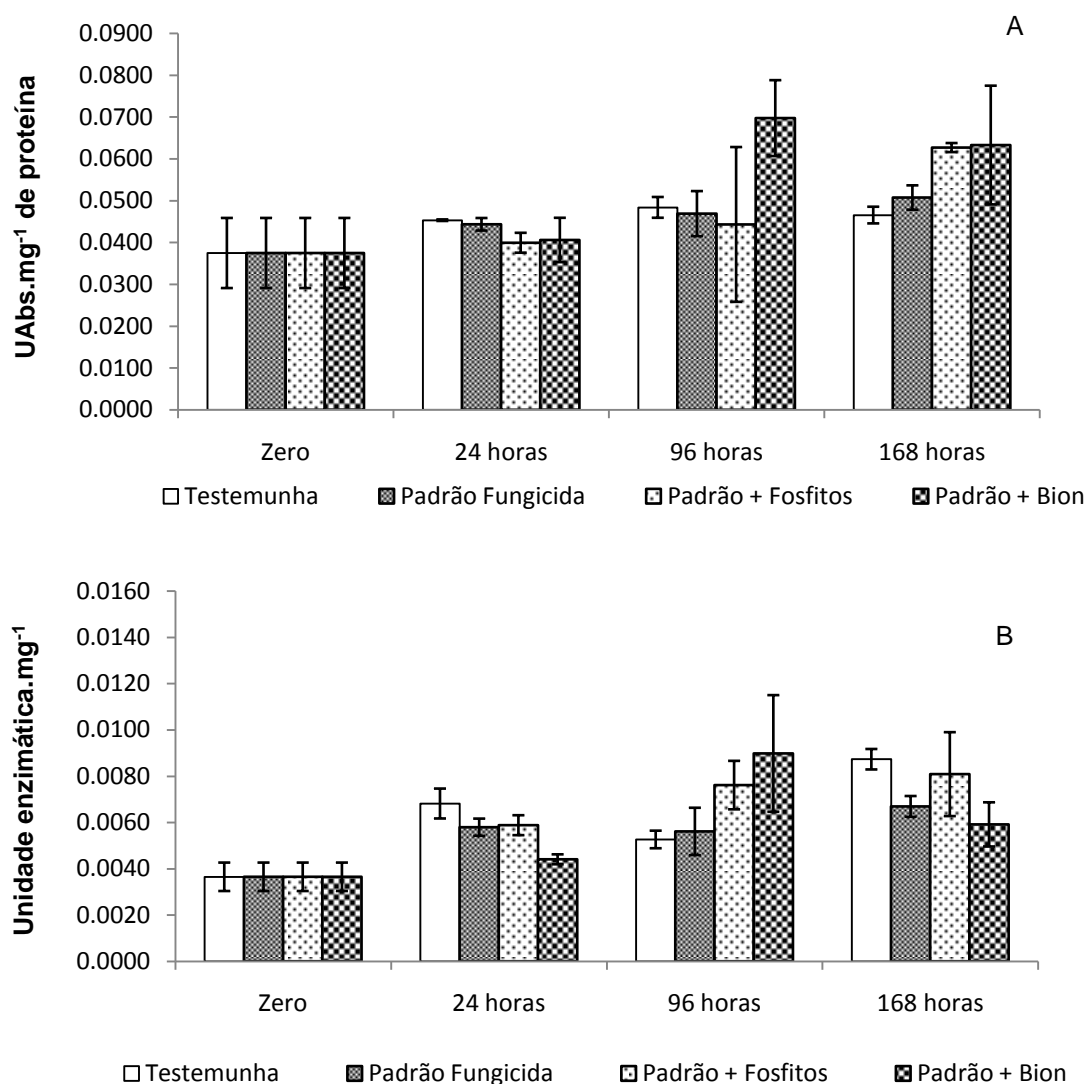
Almeida et. al (2012) encontraram atividade constante de FAL, em todos os tempos avaliados, de forma indicativa a expressão constitutiva de metabólitos secundários, pois a resposta da fenilalanina amônia-liase gera precursores de compostos fenólicos que se acumulam em resposta a infecção, um exemplo é a lignina, sendo que esta enzima esta relacionada a primeira reação na síntese dos fenilpropanóis, com a conversão de fenilalanina em ácido trans – cinâmico, promovendo a geração de compostos sinalizadores de defesa.

Nesta terceira e última aplicação utilizando indutores (fosfitos e ASM), foram observados padrões mais elevados na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases, para o tratamento T10 também observou-se que, a atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases se manteve constante desde as 96 horas após aplicação até as 168 horas (Figura 9.).

O tratamento T12 obteve sua maior resposta enzimática as 96 horas após aplicação, o tratamento T10 obteve sua maior resposta em níveis de Fal as 168 horas após aplicação, tendo uma menor variação no erro padrão.

Rodrigues et al. (2006), utilizando como indutor abiótico o ASM em cultivares de feijão caupi, desafiados com 7 dias após germinação, inoculando-se esporos de *Fusarium oxysporum*, obtiveram um aumento significativo na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases. Müller (2015) trabalhando com sementes de soja tratadas com fosfito também observou incremento significativo na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases..

As respostas enzimáticas podem ser notadas principalmente a partir das primeiras horas após aplicação, e continuarem manifestando-se até dias após a aplicação, Cavalcanti et al. (2006) observou em seu trabalho com diferentes indutores no controle de mancha bacteriana em tomate que, plantas pulverizadas com ASM, apresentaram tendência de aumento em  $\beta$ -1,3 glucanases observadas em até 12 dias após aplicação.



**Figura 8:**Atividade enzimática de Fenilalanina amônialiase (FAL) (A),  $\beta$ -1,3-glucanase (B). 3ª aplicação. Tratamentos: T1, T2, T10, T12 Barras na vertical indicam o erro padrão.UTFPR – Dois Vizinhos – PR, 2016. **Fonte: Autor (2016).**

Os tratamentos T2, T10 e T12 diferenciaram-se da testemunha (T1), quanto a AACPD para a ferrugem asiática e para o míldio, e com relação a atividade de resposta de enzimas relacionadas a patogenezidade e Fal, os tratamentos T10 e T12, apresentaram picos pronunciados na atividade de Fal e  $\beta$ -1,3 glucanases nas primeiras 24 horas após aplicação,e 96 horas após aplicação respectivamente, na segunda aplicação. Nesta aplicação, o T12 apresentou pico de elevação enzimática as 96 horas e o T10 manteve das 96 horas até 168 horas, uma maior constante, demonstrando que juntamente com o controle de doenças estes tratamentos foram beneficiados com a resistência sistêmica adquirida à patógenos.

A associação de fosfitos mais fungicidas proporcionou menor avanço das doenças, conjuntamente com a resistência sistêmica adquirida, promovidos pela ativação do metabolismo secundário na rota da Fal e ativação de Proteínas Relacionadas a Patogenicidade, constatadas pela atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que todos os fosfitos e o ASM, quando associados com fungicidas apresentam eficiente controle de ferrugem asiática e míldio, com menor área abaixo da curva de progresso de doença, em comparação com a testemunha.

Mas sua utilização de forma isolada não demonstra potencial de controle dessas sobre a ferrugem asiática da soja.

Todos o produtos avaliados apresentaram potencial de ativar as enzimas FAL, B-1,3 glucanases, bem como o Ultra Mn também ativou as quitinases. Os resultados demonstraram ainda que tal ativação possui especificidade quanto ao tempo de ativação após a aplicação.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVARES, Clayton Alcarde et al. ppe's climate classification map for Brazil. **MeteorologischeZeitschrift**.V. 22, n. 6, p. 711-728. Jan. 2013. 717 p.

AGENCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ (ADAPAR). **Agrotóxicos no Paraná**. Paraná: Adapar. 2016. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=389>. Acessado em Maio de 2016.

AGNELLI, A. R..**Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria Candidatus Liberibacter asiaticus em plantas cítricas**. 2011. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquará, 2011.

BARRETO, N.D.S. **Utilização de fertilizantes a base de fosfito e micronutrientes na cultura do melão**. 2008. Dissertação. Universidade Federal do Semiárido. Mossoró. 2008

BONALDO, S.M; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência: Noções Básicas e Perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Ed.). *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 14-15.

BORSATTI, F.C et al. Indução de Resistência e Qualidade Pós-Colheita de Amora Preta Tratada com Ácido Salicílico. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n.2, p. 318-326, Junho de 2015. Disponível em : <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452015000200318&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452015000200318&lng=en&nrm=iso)>. Acessado: 23 nov. 2016

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Culturas: soja-saiba mais**. Brasília: Mapa 2016. Disponível em : <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais>

BRASIL. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) **Ibama e SDA proíbem a utilização de alguns ingredientes ativos em culturas de algodão**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/01/ibama-e-sda-proibem-a-utilizacao-de-alguns-ingredientes-ativos-em-culturas-de-algodao>>. Acesso em: 01 maio 2016

BRACKMANN, A. et al. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs "Fuji" durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1039-1042, jul-ago. 2004.

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

BRANDÃO, R.P. Fosfito estimula a autodefesa das plantas contra doenças fúngicas. Informativo Bio Soja. Ano II, n.3. São Joaquim da Barra. 2006. Disponível em: <http://www.biosoja.com.br/informativo.htm> Acesso em 02 de jun 2007

CARMONA, M; SAUTUA, F. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. Revista Plantio Direto, Passo Fundo – RS, n. 126, p.19-22. novembro/dezembro. 2011.

CAVALCANTI, L.S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Eds.). Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ, p.81-124. 2005

CAVALCANTI, L.S. et al. Atividades de quitinase e beta- 1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, n12. 2006.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA (EMBRAPA SOJA). **Soja em números (safra 2013/2014)**. Embrapa. Londrina – PR. 2015. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em: 21 mai. 2015.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Biometria, Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006

DALIO, R.J.D.; RIBEIRO JUNIOR, P.M; RESENDE M.L.V.; SILVA, A.C.; BLUMER S.; PEREIRA, V.F.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S.F. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. In: LUZ, W.C. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas-RAPP**, Passo Fundo, v.20, p. 206-242. 2012.

DUARTE, H da S. S. et al. Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. **Ciencia. Rural** [online]. 2009, vol.39, n.8, pp.2271.

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.** tecnologia de produção de soja: região central do brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

FERNANDES, L.H.M..**ACIBENZOLAR-S-METIL NO MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM E CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO.** 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009

GADAGA, Stelio Jorge Castro. **FOSFITOS NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO *Phaseolus vulgaris* L. CONTRA ANTRACNOSE.** 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

GODOY, C.V; *et al.* Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology.** Brasil, v. 34, n. 1, p. 56-61, Jan-Fev 2009.

GODOY, C. V.; KOGA, L.C.; CANTERI, M.G.. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatol. bras.**, Brasília , v. 31, n. 1, p. 63-68, Fev. 2006 .

GODOY, C.V.; et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica 103**, Londrina, PR, ago. 2014

GODOY, C.V.; et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica 119**, Londrina, PR, ago. 2016

GONÇALVES;E.C.P. et al. Avaliação da reação de genótipos de soja ao oídio em diferentes condições. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.151-153, 2009.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*.** Tese (Doutorado) 236p. Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, 2004.

HARDY, G.E.St.J et al. The future of phosphite as a fungicide to control the soil borne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Orange, V.30, p. 133-139, 2001.

HENNING, A. A. et al. Manual de identificação de doenças da soja. Londrina: Embrapa-CNPSO, 5 ed. 76p. 2014.



JONES, J.D.G; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature** 444: p. 323-329. 2006.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1936. Wall-map 150cmx200cm.

KOWATA, Ligia Saiko et al. Escala Diagramática para avaliar severidade de míldio na soja. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p.105-110, 2008. Disponível em: <Dialnet-EscalaDiagramaticaParaAvaliarSeveridadeDeMildioNaS-2902005.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2016.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**. n.107. p 07-12. 2001

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-s-methyl e *Bacillus cereus***: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

KUHN, R. A.; PORTZ, R. L.; STARGALIN, J.r.. Uso da Biomassa Cítrica no Controle de Doenças da Soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Candido Rondon, v. 8, n. 1, p.85-98, jan. 2009

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant&CellPhysiology**.Tokyo, v. 23, p. 1091-1101, 1972.

MATSUO, Éder et al . Inheritance and genetic mapping of resistance to Asian soybean rust in cultivar TMG 803. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, Viçosa, v.14, n.4, p.209-215, Dez, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-70332014000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332014000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en). Acessado em: 28 mai. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332014v14n4a33>.

MAZARO, S. M. et al. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS FOLIARES E DE FLORES EM MORANGUEIRO POR QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 18, n. 2-4, p.143-150, 1 jun. 2012. Disponível em: <<http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/2503/2329>>. Acesso em: 29 jun. 2015.

MENEGHETTI, R. C.. **Avaliação do Fosfito de Potássio Sobre o Progresso de *Phakopsora pachyrhizi* em Soja**. 2009. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rs, 2009.

MÜLLER. I. **Indução de resistência e tratamento de sementes de soja com fosfitos de potássio**. 2015. 117f. Dissertação (mestrado) – Curso de agronomia, Programa de pós graduação em agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – PR, 2015.

NOJOSA, G. B. de A.; RESENDE, M. L.V.; RESENDE, Á. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. p.140. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, Piracicaba, v.13, p.139-143, 2005.

OLIVEIRA, G. M. de et al. Fosfito e silicato de potássio no controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd). **Agraria: Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 10, n. 1, p.60-65, jan. 2015.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.1-51, 1994.

PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B.. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, Armando; KIMATI, Hiroshi; AMORIM, Lilian (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceito**. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995.

PASCHOLATI, S.F. et al. Indução de resistência no controle de fitopatógenos: registro de indutores e uso comercial no Brasil. p.235. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F et al. (Ed.) **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM, 272p. 2014.

PIRES, J.L.F. et al. Efeito de populações e espaçamentos sobre o potencial de rendimento da soja durante a ontogenia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1541-1547, 2000.

REGINATO, P.. **IMPACTO DO MÍLDIO NA PRODUTIVIDADE DA SOJA NO SUL DE MATO GROSSO DO SUL, SAFRA 2006/2007**. 2008. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2008. Cap. 2. Disponível em: <[http://www.ufgd.edu.br/tesdesimplificado/tde\\_arquivos/1/TDE-2009-10-26T101740Z-92/Publico/PriscilaReginato.pdf](http://www.ufgd.edu.br/tesdesimplificado/tde_arquivos/1/TDE-2009-10-26T101740Z-92/Publico/PriscilaReginato.pdf)>. Acesso em: 01 maio 2016

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência em *Fusariumoxysporum*f. SP, tracheiphilum em caupi: eficiência de indutores abióticos e bióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira** 31: 492-499, 2006.

SECRETÁRIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Boletim Informativo Diário 28/04/2015**. Departamento de Economia Rural (DERAL). 28 abr.2015, às 08h50min. Disponível em:<  
<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/qas/aviso.php?codigo=4316>>

SILVA, O. C. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar- S- metilico associados a fungicidas para o controle de doenças foliares na cultura da soja. **Tropical Plant Pathology**, Ponta Grossa, v. 38, n. 1, p.72-77, fev. 2013

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Setor de defensivos agrícolas reduz crescimento em 2014**. São Paulo – SP; 23 abr. 2015. Disponível em:  
[http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco\\_2014.pdf](http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco_2014.pdf) Acessado em: 21 mai. 2015.

SÔNEGO, O.R; GARRIDO, L da R. Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfito de potássio e de fosfonato de potássio no controle do míldio da videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 13p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 60).

STEINER, U; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: soybean rust in cultivar TMG 803. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, Viçosa ,v.14, n.4, p.209-215, Dez. 2014. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-70332014000400001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332014000400001&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em:28 Mai 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332014v14n4a33>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colourimetric assay for endoacting cellulase, xylanase, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.511-519, 1990.

YORINORI, J.T. Doenças da soja no Brasil. In:*Fundação Cargill (Ed.). Soja no Brasil Central*. Campinas: Fundação Cargill, p. 301-363. 1986.

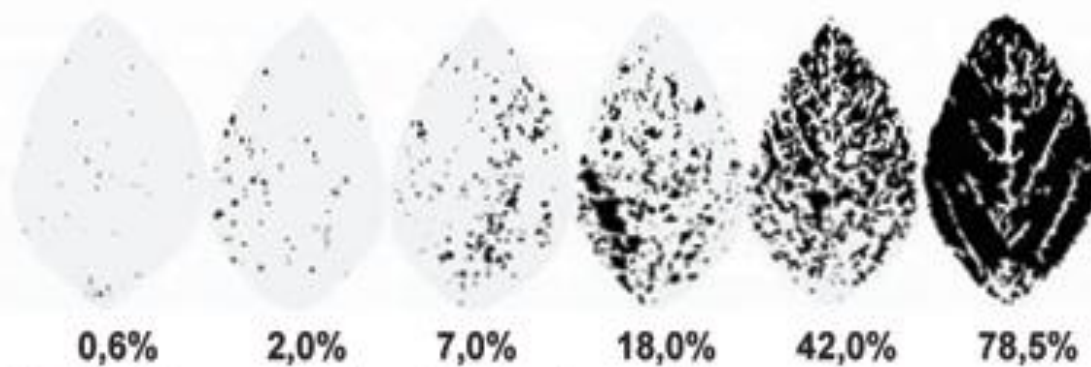
YORINORI, J.T.; et al. Perdas ocasionadas pela ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*). **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. S210, 2003.

YORINORI, J.T.; JUNIOR, J.N.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem “asiática” no Brasil: evolução, importância econômica e controle.** n 247. p. 09-10 Embrapa soja, ISSN 1516-781X Londrina – PR. Dez.2004.

ZAMBOLIN, L. **Resistência de fungos a fungicidas.** In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA. 33., 2010, Ituverava-SP. Sobrevivendo na crise. Disponível: <http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2010/palestras/p14.htm>. Acesso em 26 abr. 2015.

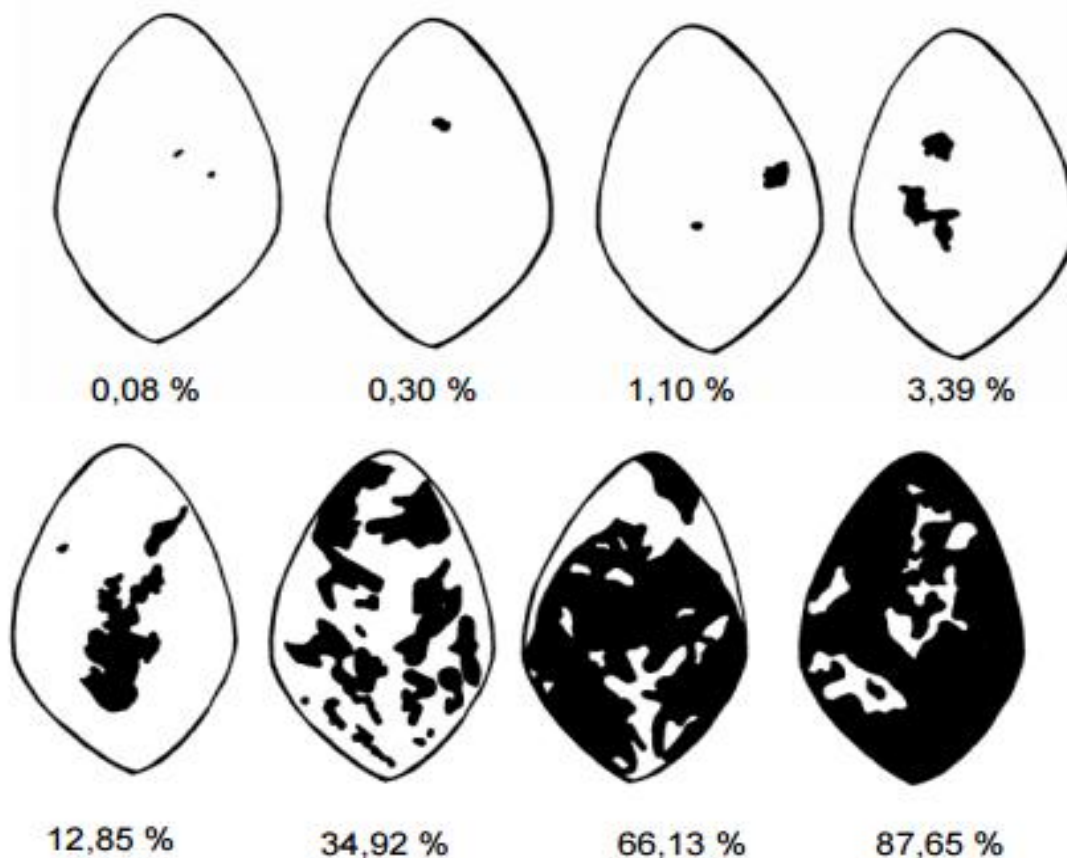
## **ANEXOS**

**ANEXO A – Escala Diagramática para avaliação de severidade de ferrugem asiática da soja causado por *Phakopsora pachyrhizi* (Porcentagem de área foliar doente).**



Fonte: Godoy et al. (2006)

**ANEXO B – Escala Diagramática para avaliação de severidade de Míldio em soja causado por *Perenospora manshurica* (porcentagem da área foliar coberta com sintomas)**



Fonte: Kowata et al. (2008)