



ARIANA ELISEI VILELA

**TRANSLOCAÇÃO DE FOSFITO NA PRESENÇA DE
FUNGICIDAS EM PLANTAS DE SOJA E SEU EFEITO NO
CONTROLE DE OÍDIO**

**LAVRAS - MG
2018**

ARIANA ELISEI VILELA

**TRANSLOCAÇÃO DE FOSFITO NA PRESENÇA DE FUNGICIDAS EM PLANTAS
DE SOJA E SEU EFEITO NO CONTROLE DE OÍDIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título
de Doutora.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vilela, Ariana Elisei.

Translocação de fosfito na presença de fungicidas em plantas
de soja e seu efeito no controle de oídio / Ariana Elisei Vilela. -
2018.

70 p.: il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. Translocação. 2. Fosfito. 3. Oídio. I. Resende, Mário Lúcio
Vilela de. II. Título.

ARIANA ELISEI VILELA

**TRANSLOCAÇÃO DE FOSFITO NA PRESENÇA DE FUNGICIDAS EM PLANTAS
DE SOJA E SEU EFEITO NO CONTROLE DE OÍDIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título
de Doutora.

APROVADA em 28 de novembro de 2018.

Dr. Paulo César Magalhães

Dr. Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros

Dr. Eduardo Alves

Dr. Bruno Henrique Garcia Costa

EMBRAPA Milho e Sorgo

DAG/UFLA

DFP/UFLA

Agrichem do Brasil

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

À Deus, por todas as bênçãos

OFEREÇO

Aos meus pais Antonio Ary e Ana

A minha tia avó Saide

Ao Leo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar presente em minha vida e nunca me desamparar.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do doutorado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, ensinamentos e amizade.

À Professora Dra. Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, pela imensa ajuda, paciência e amizade durante essa fase final de conclusão do meu trabalho.

Aos membros da banca Dr. Paulo César, Dr. Bruno Henrique e Professor Dr. Eduardo por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia pela agradável convivência em especial a funcionária Adriana por todas as suas orações.

Aos professores do programa de pós-graduação do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo Deila, Mariana, Tharyn, Manoel, Bárbara, Joyce, Alexandre, Stéfanny, Dario, Fábio, Juliana, Maria Eduarda, Gustavo, Brunão, Priscilla, Moisés, Eliane, José Diogo, João Paulo, pelo convívio, ajuda e pelos bons momentos de descontração e em especial à Ana Cristina, Wilder e Matheus pela imensa ajuda prestada.

À Marluce por toda sua gentileza e por estar sempre disponível a me ajudar.

Aos Laboratórios de Genética Molecular (INOVA-Café) e Fisiologia Molecular de Plantas da UFLA pela disposição dos equipamentos.

Ao Laboratório de Modelagem Molecular, do Departamento de Química da UFLA, em especial ao Professor Teodorico e ao colega Lucas pela disposição em nos ajudar.

A todos os colegas e amigos da pós-graduação, em especial ao Cristian, Bruna, Aline, Gilmar, Renata, Camila, pela amizade e pelos bons momentos de descontração.

Aos meus pais Antonio Ary e Ana e a tia Saide pelo apoio incondicional durante todos os momentos.

Ao meu namorado Leonardo, pelo imenso apoio, companheirismo, paciência, por estar sempre ao meu lado e nunca ter negado esforços para me ajudar.

A minha madrinha Terezinha e a minha tia avó Nivalda pelas orações.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Rafael e Luna, aos meus sobrinhos de coração Tereza Maria, Ana Vitória, Maria Fernanda, Caetano, Isabela e Yasmin pela alegria e por fazer parte da minha vida.

Aos meus irmãos, Ari e Guto, às minhas irmãs de coração Ana Paula e Carmem Rose e às minhas cunhadas Andreia, Joana e Samantha por sempre torcerem por mim.

À minha sogra Regina por sempre me incentivar.

Às minhas amigas Juliana e Débora pela amizade.

E o meu agradecimento especial vai a todas as pessoas, que por ventura não foram mencionadas, mas que de alguma forma fez parte desta minha caminhada.

MUITO OBRIGADA!

“Felicidade começa com Fé”

(Moacyr Franco)

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

(Clarisse Lispector)

RESUMO GERAL

A soja é uma cultura que se destaca pela extrema importância na produção agrícola nacional e mundial, mas vários são os fatores que afetam a sua produtividade, principalmente as doenças. E a forma mais utilizada de combatê-las é por meio do controle químico. Porém, a maioria das doenças se desenvolve nos terços inferiores das plantas, o que gera dificuldade de controle devido à baixa porcentagem de produto que se deposita nesta região. Por isso, o uso de produtos alternativos que possam aumentar a eficiência quando associados a fungicidas vem sendo amplamente empregado. Assim, o fosfito de potássio representa um desses produtos com resultados satisfatórios no manejo de doenças. Entretanto, são poucos os estudos relacionados aos efeitos da associação entre fungicidas e fosfitos e a forma de translocação destes. O objetivo do presente trabalho foi verificar, em casa de vegetação, o potencial do fosfito de potássio no controle de doenças, sendo aplicado isolado ou associado a diferentes fungicidas. Também objetivou-se elucidar o modo de ação desta combinação em diferentes partes da planta. Para isso, o primeiro estudo foi realizado com o intuito de verificar a possível translocação do fungicida associado ao fosfito de potássio por meio da avaliação da severidade do oídio em diferentes trifólios da planta. Além da análise de concentração de fósforo e modelagem teórica computacional para averiguar a interação entre as moléculas do fungicida e fosfito. No segundo estudo, avaliou-se também, a atividade sistêmica da indução de resistência em diferentes trifólios com a aplicação de fosfito e fungicida. Desse modo, os resultados do primeiro estudo, com ensaios realizados em casa de vegetação, apontaram a eficiente redução da severidade do oídio nas folhas inferiores quando o fosfito de potássio foi associado ao fungicida. Quanto às análises de concentração de fósforo observou-se que o fosfito foi capaz de translocar via xilema e floema e que ocorreu um aumento na concentração nas folhas baixas quando este foi associado ao fungicida. Com a análise dos resultados teóricos computacionais, pôde-se inferir que as moléculas de fosfito e de fungicida são capazes de interagir uma com a outra, sendo um atributo vantajoso para carrear o fungicida de forma descendente. Já no segundo estudo, realizado por meio de análises bioquímicas, os resultados mostraram a ação sistêmica dos tratamentos utilizados para todas as enzimas avaliadas, porém somente os tratamentos com fosfito de potássio associado ao fungicida apresentaram maior porcentagem de controle do oídio nas folhas baixas. Mediante a todos os resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que a ação efetiva da associação entre fosfito e fungicida no controle do oídio, e os resultados obtidos nesta investigação se apresentam promissores como uma ferramenta adicional para o controle de diversas doenças.

Palavras-chave: Controle. Translocação. Sistemicidade. Enzimas de defesa.

ABSTRACT

Soybean is a crop that stands out for its extreme importance in national and global agricultural production, but there are several factors that affect the productivity, especially diseases. And the most used way to fight them is through chemical control. However, most diseases develop in the lowest part of the plants, which creates control difficulties because to the low percentage of product that is deposited in this region. For this reason, the use of alternative products that can increase efficiency when associated with fungicides has been widely used. Therefore, potassium phosphite represents one of these products with satisfactory results in the management of diseases. However, there are few studies related to the effects of the association between fungicides and phosphites and the translocation way them. The objective of this study was to verify, in a greenhouse, the potential of potassium phosphite in disease control, being applied alone or associated with different fungicides. It also aimed to elucidate the mode of action of this combination in different parts of the plant. For this, the first study was carried out in order to verify the possible translocation of the fungicide associated with potassium phosphite by assessing the severity of powdery mildew in different trifolios of the plant. Besides analyzing of phosphorus concentration and theoretical computational modeling to ascertain the interaction between the fungicide and phosphite molecules. In the second study, it was also evaluated the systemic activity of resistance induction in different trifolios with the application of phosphite and fungicide. Thus, the results of the first study, with tests carried out in a greenhouse, showed an efficient reduction in the severity of powdery mildew in the lower leaves when potassium phosphite was associated with the fungicide. Regarding the analysis of phosphorus concentration, it was observed that the phosphite was able to translocate via xylem and phloem and that there was an increase in the concentration in the lower leaves when it was associated with the fungicide. With the analysis of the theoretical computational results, it was possible to infer that the phosphite and fungicide molecules are capable of interacting with each other, being an advantageous attribute to carry the fungicide downwards. In the second study, carried out by means of biochemical analyzes, the results showed the systemic action of the treatments used for all evaluated enzymes, but only treatments with potassium phosphite associated with the fungicide showed a higher percentage of powdery mildew control in the lower leaves. Based all the results obtained with the present study, it can be concluded that the effective action of the association between phosphite and fungicide in the control of powdery mildew, and the results obtained in this investigation are promising as an additional tool for the control of several diseases.

KEY WORDS: Control. Translocation. Systemic. Enzymes of defense.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS.....	16
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	19
ARTIGO 1 - Severidade do oídio e detecção sistêmica de fosfito associado a fungicidas em plantas de soja.....	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Ensaio I – Severidade do oídio em soja	24
2.1.1 Obtenção do material vegetal.....	24
2.1.2 Proteção de plantas de soja contra oídio	24
2.2 Ensaio II – Translocação de fosfito em plantas de soja	26
2.1 Obtenção do material vegetal.....	26
2.2 Aplicação dos tratamentos e coleta do material para análise química.....	26
2.3 Determinação de fósforo/fosfito pelo método colorimétrico	27
2.4 Método teórico - Análise da interação fungicida-fosfito e sua influência no carreamento do solatenol e azoxistrobina em plantas.....	29
3 RESULTADOS	30
3.1 Ensaio I – Severidade do oídio em soja	30
3.2 Ensaio II – Translocação de fosfito em plantas de soja	31
3.3 Interação fungicida-fosfito e sua influência no carreamento do solatenol e azoxistrobina em plantas.....	33
4 DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO 2 - Fosfito de potássio associado a fungicida na proteção de plantas de soja – Análises Moleculares e Bioquímicas.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Obtenção do material vegetal.....	47
2.2 Tratamentos e aplicação dos produtos	47

2.3 Proteção de plantas de soja contra oídio	48
2.4 Coleta do material para análises moleculares e bioquímicas	48
2.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR	49
2.6 Análise da atividade enzimática	51
3 RESULTADOS	52
3.1 Proteção de plantas de soja contra oídio	52
3.2 Análise da expressão dos genes <i>PAL</i> , <i>PR3</i> e <i>LOX</i>	55
3.3 Atividade das enzimas PAL, POX, SOD e APX	57
4 DISCUSSÃO	63
5 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa cultivada a cerca de cinco mil anos e que foi introduzida no Brasil no final do século XIX (DALL'AGNOL, 2016). Atualmente é produzida em praticamente todos os estados brasileiros e representa a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas três décadas. Corresponde a 57% da área plantada com grãos no país, com cerca de 35 milhões de hectares e produção de aproximadamente 119,3 milhões de toneladas na safra 2017/2018, 4,6% superior à safra 2016/2017. Este fato confere ao país o segundo lugar na produção mundial de soja, superado apenas pelos Estados Unidos (CONAB, 2018).

Com grande importância no sistema de produção agrícola brasileiro e mundial, a participação do agronegócio no PIB brasileiro está fortemente ligada às exportações dos produtos originários desta cultura, que representa aproximadamente 16% das exportações nacionais no ano de 2018. O consumo mundial de soja e seus subprodutos vêm crescendo nos últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento como a China, Brasil e Índia (CONAB, 2018). Os grãos são utilizados em larga escala na produção de diversos produtos, destacando o óleo de soja como um dos mais consumidos pela população mundial no preparo de alimentos. Além disso, os grãos também são destinados à produção de farinhas, farelos, sabão, cosméticos, resinas, tintas, solventes, biodiesel e rações animais (KIM et al., 2016).

Apesar da grande produção nacional de soja, nem sempre é possível atingir o máximo de produtividade esperado devido a fatores bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam as doenças (GODOY, 2009). No Brasil há cerca de 40 doenças já identificadas, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Dentre as principais doenças fúngicas podem-se citar a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), o oídio (*Microsphaera diffusa*), a mancha alva (*Corynespora cassiicola*), a cercosporiose (*Cercospora kikuchii*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e o oomiceto míldio (*Peronospora manshurica*). Entretanto, o aumento progressivo da área plantada no país pode ocasionar o aumento do número de doenças, e a importância econômica de cada doença pode variar com o decorrer dos anos, de região para região e de acordo com os fatores climáticos de cada safra (GRIGOLLI, 2015).

O oídio, objeto de estudo deste trabalho, é causado pelo fungo *M. diffusa* e ganhou importância no Brasil a partir da safra 1996/97. A doença foi relatada ocorrendo desde a região Sul até as regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil ocasionando, nas lavouras mais

afetadas, perdas de rendimento que variaram entre 25% a 40% (YORINORI, 1997; SILVA; SEGANFREDO, 1999; ALMEIDA et al., 2008; EMBRAPA, 2013). A doença se desenvolve em toda a parte aérea da planta (folhas, hastes, pecíolos e vagens) e os sintomas característicos são a presença de uma fina camada de micélio e esporos pulverulentos que podem evoluir e recobrir totalmente as partes infectadas. Todos os estágios de desenvolvimento da planta podem ser infectados, porém durante o início da floração os sintomas se tornam mais visíveis (LOHNES et al., 1993; IGARASHI et al., 2010).

Devido à baixa disponibilidade de sementes de cultivares resistentes, o tratamento químico, por meio de produtos fitossanitários, ainda é a principal alternativa para os produtores de soja e o mais recomendado como medida emergencial (YORINORI, 1997; DALL'AGNOL, 2016). Existe disponível no mercado uma grande variedade de fungicidas com os mais diversos modos de ação sobre os mais diferentes patógenos. Os principais grupos químicos utilizados para o controle de doenças da soja são: benzimidazóis, triazóis, estrobilurinas e carboxamidas (GODOY; MEYER, 2014). Os fungicidas sistêmicos quando aplicados, podem penetrar a cutícula e a translocação ocorre via apoplasto, apresentando movimento em profundidade/translaminar, ou atingir o xilema e se deslocar no sentido acropetal. Já a translocação via floema (basipetal) é restrita somente a alguns produtos (STEFANELLO, 2018). A absorção e mobilidade de um fungicida são influenciadas por algumas propriedades físico-químicas das moléculas, sendo que a lipofilicidade afeta significativamente as taxas de absorção e mobilidade dos produtos na folha (KLITTICH, 2014).

A lipofilicidade é uma propriedade molecular que expressa a afinidade de um composto por uma fase orgânica (apolar) em relação a sua afinidade por uma fase aquosa (polar). Quanto mais intensas forem as interações hidrofóbicas entre o composto e a fase orgânica, maior será a sua lipofilicidade. Por outro lado, quanto mais intensas forem as interações polares entre o composto e a fase aquosa, maior será a sua afinidade pela fase aquosa (maior hidrofiliabilidade), e conseqüentemente menor será a sua lipofilicidade (TESTA, 1996; MALVEZZI, 2003; CARON, 2008). Um parâmetro frequentemente empregado para expressar a lipofilicidade é o *logKow* que é o log do coeficiente de partição (KOW) de um composto entre octanol e água (solubilidade do composto no octanol/solubilidade do composto em água) (HANS, CHFUJITA, 1964; TAYLOR, 1990; KUBINIY, 1993; LOMBARDO, 2008; MARTEL et. al., 2013). Levando-se em consideração os valores do *logKow* para os fungicidas, quanto menor o valor do *logKow* (valores ≤ 3) maior será a sua

lipofilicidade e maior será a translocação das moléculas dentro dos tecidos vegetais (KLITTICH, 2014).

As aplicações de fungicidas são realizadas via pulverizações nas mais diversificadas formas, classificadas de acordo com a energia utilizada para a fragmentação das gotas (MEWES et al., 2013). Entretanto, a cobertura pelos produtos aplicados durante as pulverizações ficam mais restritas ao terço médio e superior das plantas e, segundo Cunha et al. (2008), somente 7% destes produtos chegam ao baixeiro da cultura. Desta forma, diminui-se a porcentagem de controle no terço inferior o que facilita o progresso e a intensidade de doenças com fase inicial de desenvolvimento nestas partes das plantas. O oídio é uma doença com tais características e a deficiência no controle inicial permitirá a multiplicação e disseminação do patógeno na parte inferior da folhagem, tornando cada vez mais difícil o acesso do fungicida a essa parte da planta, à medida que elas crescem (BARBOSA, 2012). Além disso, o controle químico com o uso de fungicidas pode causar seleção de patógenos resistentes, e devido a este fato, a utilização de produtos alternativos se torna cada vez maior na busca por potencializar a ação dos fungicidas no campo.

O uso de fosfitos é uma alternativa muito divulgada em cultivos extensivos, principalmente no manejo de doenças em soja (CARMONA; SAUTUA, 2011). O fosfito é um composto obtido a partir da neutralização do ácido fosforoso (H_3PO_3) por uma base como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio entre outros (DALIO et al., 2012). Possui como propriedade efeito fungicida, atuando diretamente sobre o patógeno (SILVA et al., 2013). Quando aplicados na planta, e após serem adsorvidos, as moléculas são dissociadas e o íon fosfito é liberado (LOVATT; MIKKELSEN, 2006). Este íon transloca sistemicamente via vasos condutores (xilema e floema) (DALIO et al., 2012). Podem ser utilizados isolados ou em combinação com fungicidas, auxiliando na redução da intensidade de doenças causadas por diferentes patógenos (CARMONA; SAUTUA; 2011; DELIOPOULOS et al., 2010). Além disso, são capazes de induzir respostas de defesa na planta ativando moléculas sinalizadoras capazes de induzirem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de defesa, como as proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (MENEHETTI et al., 2010; MÉTRAUX, 2001; VIDHYASEKARAN, 1988).

Apesar de serem amplamente empregados, não se sabe ao certo o que ocorre quando há a associação entre fosfito e fungicida. Com isso, objetivou-se no presente trabalho avaliar, o potencial de controle dessa associação em diferentes partes da planta para o fungo *M. diffusa* e elucidar alguns dos mecanismos de ação envolvidos nesta interação por meio de análises químicas e computacionais, bioquímicas e moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; BINNECK, E.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; VALLE, P. R. Z. R. D. O.; SILVEIRA, C. A. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 30, n. 1, p. 20-26. 2008.
- BARBOSA, G.F. **Manejo integrado da ferrugem asiática da soja na região de Jaboticabal**. 2012. 126 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.
- CARMONA, M.; SAUTUA; F. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, p. 19-22, 2011.
- CARON, G.; ERMONDI, G. in MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. **Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction**, vol. 37, Weinheim: Wiley-VCH, cap. 12, p. 315-328, 2008.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Décimo segundo levantamento da safra 2017/2018 de grãos / Setembro de 2018**. Disponível em <file:///C:/Users/-098yr4w/Downloads/BoletimZGraosZsetembroZ2018%20.pdf>. Acesso em 24/09/2018 às 10:00.
- CUNHA, J.P.A.R. da et al. Efeito de pontas de pulverização no controle químico da ferrugem da soja. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 283-291, 2008.
- DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.
- DALL'AGNOL, A. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília, DF: Embrapa, 71 p. 2016.
- DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Newport, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, May 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Sistemas de produção 16: tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p.
- 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. Londrina: Embrapa Soja, v. 34, n. 1, p. 51-61, 2009.
- GODOY, C.V.; MEYER, M.C. Resistência a fungicidas na cultura da soja. **Informativo Meridional**. Fundação Meridional de Apoio à Pesquisa Agropecuária, 2014.
- GRIGOLLI, J. F. J. **Manejo de doenças na cultura da soja**. In: LOURENÇÃO, A. L. F. (Ed.); Tecnologia e Produção: Soja 2014 / 2015. Curitiba : Midiograf, p. 134-156, 2015.

HANSCH, C.; FUJITA, T. p-s-pi Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. **J. Am. Chem. Soc. Washington**, v. 86, p. 1616, 1964.

IGARASHI, S. et al. Danos causados pela infecção de em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 245-250, 2010.

KIM, E.; HWANG, S.; LEE, I. SoyNet: a database of co-functional networks for soybean *Glycine max*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 1, p. 1-13, 2016.

KUBINYI, H. QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches, v. 1. **Edited by R.Mannhold, P.Krosgaard-Larsen, and H.Timmerman**. Weinheim: VCH, 1993.

LOHNES, D. G.; WAGNER, R. E.; BERNARD, R. L. Soybean genes Rj2, Rmd, and Rps2 in linkagegroup 19. **Journal of Heredity**, v. 84, n. 2, p. 109-111, 1993.

LOMBARDO, F., et al., in MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction, Weinheim: Wiley-VCH, v. 37, cap. 16, p. 407-430, 2008.

LOVATT, C. J. & MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, v. 90, p. 1-11, 2006.

MALVEZZI, A. Estudo comparativo de parâmetros hidrofóbicos e relacionados à ionização de série de derivados da procaína com atividade bloqueadora neuromuscular. 2003. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTEL, S.; GILLERAT, F.; CAROSATI, E.; MAIARELLI, D.; TETKO, I. V.; MANNHOLD, R.; CARRUPT, P.A. Large, chemically diverse dataset of logP measurements for benchmarking studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 21–29, 2013.

MENEGHETTI, R.C. et al. Avaliação da ativação de defesa em soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 823-829, 2010.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, Nov. 2001.

MEWES, Walter Luis Castro et al . Aplicação de agrotóxicos em eucalipto utilizando pulverizador pneumático. **Rev. Árvore**, Viçosa , v. 37, n. 2, Apr. 2013.

SATCHIVI, et al.; In Retention, Uptake, and Translocation of Agrochemicals in Plants. In: KLITTICH, C. J. R. Fungicide Mobility and the Influence of Physical Properties. 2014, p. 95-109

SILVA, O. C.; SEGANFREDO, R. Quantificação de danos ocasionados por doenças de final de ciclo e oídio, em duas variedades de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 460.

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

STEFANELLO, Marlon. Direções alternativas dos agrotóxicos na folha. Disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/alternativas-agrotoxicos-folha/>>. Data de acesso: 22 de outubro de 2018a.

TAYLOR, P. J. Hydrophobic properties of drugs, p. 241, in HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B. **Comprehensive Medicinal Chemistry**, v. 4, Oxford: Pergamon Press, 1990.

TESTA, B., et al., in PLISKA, V.; TESTA, B.; VAN DER WATERBEEMD, H. Lipophilicity in drug action and toxicology, vol. 4, Weinheim (Germany): VCH Publishers, cap. 4, p. 49-70, 1996.

VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: _____. **Physiology of disease resistance in plants**. Boca raton: CRC, 1988. v. 2, p. 121-135.

YORINORI, J. T. **Oídio da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 5 p. (Comunicado Técnico, 59).

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – Detecção sistêmica de fosfito associado a fungicidas e manejo do oídio em plantas de soja

¹Ariana Elisei Vilela et al.

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução do Manual de Normalização da UFLA.

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Autor para correspondência: Ariana Elisei Vilela, e-mail: aevilela@gmail.com

RESUMO

Os fosfitos vêm sendo amplamente empregados no controle de diversas doenças da cultura da soja. Entretanto são escassos os estudos referentes ao modo de ação desses produtos na referida cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de Fosfito de Potássio em associação com fungicidas no manejo do oídio, além de monitorar o íon fosfito em diferentes partes da planta por meio de colorimetria e cálculos computacionais. Dois ensaios foram realizados em casa de vegetação sendo o primeiro para avaliar a severidade do oídio em soja com diferentes aplicações de fosfito e fungicidas. As plantas foram pulverizadas com os seguintes tratamentos: Protiokonazol + Trifloxtrobina (Pro + Tri) ($0,4 \text{ L ha}^{-1}$), Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Azo + Ben) ($0,2 \text{ Kg ha}^{-1}$) e a associação entre estes fungicidas e Fosfito de Potássio (Phi) ($0,5 \text{ L ha}^{-1}$) aplicados no quarto trifólio; Pro + Tri ($0,4 \text{ L ha}^{-1}$), Azo + Ben ($0,2 \text{ Kg ha}^{-1}$) aplicados na planta toda e uma testemunha sem aplicação, totalizando sete tratamentos. Foram realizadas 5 avaliações da severidade do oídio com intervalos de 7 dias. O segundo ensaio foi realizado para avaliar a translocação de fosfito na planta. Os tratamentos utilizados foram: Azo + Ben ($0,2 \text{ Kg ha}^{-1}$) e Phi ($0,5 \text{ L ha}^{-1}$), a associação entre os dois produtos citados aplicados somente no segundo trifólio e na planta toda, além de um tratamento testemunha, totalizando sete tratamentos. Foram coletados os primeiros, segundos e terceiros trifólios, separadamente 24h após a aplicação dos produtos para análise química foliar. Além disso, cálculos computacionais foram realizados para compreender a interação entre fosfito-fungicida e sua influencia na translocação dessas moléculas. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Em relação ao primeiro ensaio, houve diferença estatística entre os tratamentos. A associação entre os fungicidas e o fosfito, quando aplicados somente no quarto trifólio, apresentou menor área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para as folhas baixas comparando-se à testemunha. No segundo ensaio, foi detectado fosfito em todas as folhas e a presença do fungicida foi capaz de aumentar a concentração do fosfito em todas as folhas analisadas. Os resultados teóricos mostraram uma possível interação entre as moléculas fosfito-fungicida, destacando Phi + Ben. Desta forma, infere-se que a associação entre fosfito e fungicida foi capaz de diminuir a severidade de doenças em folhas baixas e proporcionar um aumento na concentração de fosfito em todas as folhas analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycyne max*; *Microsphaera diffusa*; Translocação; Controle.

ABSTRACT

Phosphites have been widely used to control most diseases of soybean crop. However, there are few studies on the mode of action of these products in this culture. The objective of this work was to evaluate the potential of Potassium Phosphite in association with fungicides in the management of powdery mildew, as well as to monitor the phosphite ion in different parts of the plant by colorimetry and computational calculations. Two trials were carried out in a greenhouse, the first one to evaluate the severity of soybean powdery mildew with different applications of phosphite and fungicides. The plants were sprayed with the following treatments: Prothioconazole + Trifloxtrubin (Pro + Tri) (0.4 L ha^{-1}), Azoxystrobin + Benzovindiflupyr (Azo + Ben) (0.2 Kg ha^{-1}) and the association between these fungicides. Potassium Phosphite (Phi) (0.5 L ha^{-1}) applied to the fourth trifoliolate; Pro + Tri (0.4 L ha^{-1}), Azo + Ben (0.2 Kg ha^{-1}) applied to the whole plant and one control without application, totaling seven treatments. Five of the mildew severity evaluations were realized over seven days. The second test was evaluating the phosphite translocation in the plant. The treatments used were: Azo + Ben (0.2 Kg ha^{-1}) and Phi (0.5 L ha^{-1}), the association between the two cited products applied only in the second trifoliolate and in the whole plant, as well as a control treatment, totaling seven treatments. The trefoils were collected and separated 24 hours after application of the products for foliar chemical analysis. The computational studies were performed to understand the interaction between phosphite-fungicide and its influence on the translocation of these molecules. The results obtained were submitted to the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). Regarding the first trial, there was a statistical difference between the treatments. The association between fungicides and phosphite, when applied only in the fourth trifoliolate, presented lower AUDPC for the leaves compared to the control. In the second test, phosphite was detected in all leaves and the presence of fungicide was able to increase the concentration of phosphite in all leaves analyzed. The theoretical results showed a possible interaction between the phosphite-fungicide molecules, highlighting Phi + Ben. Thus, it can be inferred that the association between phosphite and fungicide was able to decrease the severity of diseases in base leaves and provide an increase in phosphite concentration in all analyzed leaves.

KEY WORDS: *Glycine max*; *Microsphaera diffusa*; Translocation; Control.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma cultura de extrema importância no sistema nacional de produção agrícola e também mundial. No Brasil, ocupa posição de destaque e se apresenta como a cultura mais importante na produção e exportação de grãos (CONAB, 2018). Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja estão às enfermidades causadas por uma grande diversidade de fitopatógenos (JUHÁSZ et al., 2013). O método mais empregado para o manejo de doenças é o controle químico por meio do uso de fungicidas, porém, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no âmbito de integrar a esse manejo, a utilização de compostos que otimize a ação de fungicidas no campo (MACHINANDIARENA et al., 2012). Desta maneira, os fosfitos vêm recebendo uma atenção especial nessas pesquisas, pois são capazes de controlar diversas doenças causadas por oomicetos e fungos (SILVA et al., 2011; BORZA et al., 2016).

Os fungicidas possuem várias classificações de acordo com a sua mobilidade na planta. Os classificados como sistêmicos translocam, em sua maioria, de forma ascendente, ou seja, via xilema. Como exemplo pode-se citar o grupo químico dos triazóis. Os fungicidas mesosistêmicos e locossistêmicos possuem ação de profundidade dentro do tecido vegetal, e a translocação via xilema pode ser mínima ou inexistente. Neste caso, pode-se citar como exemplo o grupo químico das estrobilurinas. Em ambos os casos, as moléculas destes fungicidas são incapazes de atingir as partes baixas das plantas, quando aplicados via foliar. No entanto, a translocação e penetração do fungicida na planta esta associada a vários critérios, dentro deles a lipofilicidade e/ou solubilidade do produto em relação às membranas vegetais são os mais importantes (REIS; REIS; FORCELINI, 2007 ; AZEVEDO, 2007). O parâmetro mais utilizado para se medir a lipofilicidade é o $\log K_{ow}$. Este valor representa o coeficiente de partição de um composto entre o octanol e a água, isto é, o log da relação entre a solubilidade do composto no octanol e a solubilidade do composto em água (HANS, CHFUJITA, 1964; TAYLOR, 1990; KUBINIY, 1993; LOMBARDO, 2008; MARTEL et. al., 2013). Para os fungicidas, quanto menor os valores do $\log K_{ow}$ (valores ≤ 3) maior será a sua lipofilicidade e maior será a translocação das moléculas dentro dos tecidos vegetais (KLITTICH, 2014).

Os fosfitos são descritos na literatura como sais inorgânicos resultantes da reação de uma base forte (hidróxidos de cálcio, potássio, etc.) com o ácido fosforoso (H_2PO_3), dando origem a fosfito de cálcio, potássio, etc. (DALIO et al., 2012). Formulações a base de fosfito são utilizadas como fungicidas, bioestimulantes e fertilizantes (GÓMEZ-MERINO &

TREJO-TÉLLEZB, 2015). Seus mecanismos de ação são complexos e pouco elucidados, entretanto, estudos relatam que os fosfitos podem agir de forma direta sobre os patógenos, provocando ruptura de hifas e inibindo o crescimento micelial e na forma indireta, ativando variados mecanismos de defesa vegetal (DALIO et al., 2012). Produtos a base de fosfitos quando aplicados nas plantas são absorvidos e dissociados ocorrendo à liberação do íon fosfito (LOVATT; MIKKELSEN, 2006). Estes íons são translocados sistemicamente via floema e xilema (SCHROETTER et al., 2006), sendo que sua translocação pela planta é via floema, por meio da associação com fotoassimilados, motivo pelo qual são absorvidos rapidamente pelas folhas (GUEST & GRANT, 1991; ARAÚJO et al., 2008; BUFFARA et al., 2011). Devido a esta translocação descendente (floema), o fosfito tem sido amplamente utilizado no manejo de diversos patógenos, principalmente os radiculares. A translocação sistêmica de fosfitos via floema foi verificada em varias culturas, como batata, eucalipto, abacate e feijão por meio de diferentes técnicas de detecção do íon (BORZA et al., 2014; STASIKOWSKI et al., 2014; BORZA et al., 2016; McLEOD et al., 2018; COSTA et al., 2017).

A associação entre fosfitos e fungicidas vem crescendo no manejo de doenças, e segundo pesquisas, essa associação pode provocar efeitos aditivos e sinérgicos no controle de diversos patógenos (NEVES, 2016). Porém não se encontram na literatura trabalhos relacionados à translocação quando esses produtos são associados.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a severidade do oídio (*Microspheera diffusa*) em plantas de soja, realizar análises químicas para a detecção de fosfito na presença de fungicidas e compreender, por meio de cálculos computacionais, a interação fosfito-fungicida e sua influência na translocação dessas espécies químicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois ensaios em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, para avaliar o efeito da aplicação de fosfito de potássio e fungicidas no manejo do oídio, e para realizar a detecção sistêmica de fosfito em plantas de soja e sua interação com os produtos químicos com base em cálculos computacionais.

2.1 Ensaio I – Severidade do oídio em soja

2.1.1 Obtenção do material vegetal

Sementes de soja cultivar N5909 RR (Nidera) foram semeadas em vasos de polietileno (5 dm^3) contendo uma mistura de areia, substrato comercial e solo de barranco peneirado em uma proporção de 1:2:2 (v:v) respectivamente. Foram semeadas seis sementes por vaso e após a germinação foi realizado o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. Durante todo o período experimental, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil e irrigadas periodicamente.

2.1.2 Proteção de plantas de soja contra oídio

Os produtos utilizados foram os fungicidas formulados Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Azo + Ben), Trifloxistrobina + Proticonazol (Tri + Pro) e o fertilizante Fosfito de Potássio (Phi). As doses utilizadas foram às recomendadas pelo fabricante e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos e doses utilizados no ensaio em casa de vegetação para a avaliação da severidade do oídio em soja. Aplicação na planta toda (PT) e aplicação somente no quarto trifólio (4T).

Tratamentos	Dose
1. Azo + Ben 4T*	$0,2 \text{ Kg ha}^{-1}$
2. Tri + Pro 4T **	$0,4 \text{ L ha}^{-1}$
3. Azo + Ben + Phi 4T *	$0,2 \text{ Kg ha}^{-1} + 0,5 \text{ L ha}^{-1}$
4. Tri + Pro + Phi 4T **	$0,4 \text{ L ha}^{-1} + 0,5 \text{ L ha}^{-1}$
5. Azo + Ben PT*	$0,2 \text{ Kg ha}^{-1}$
6. Tri + Pro PT**	$0,4 \text{ L ha}^{-1}$
7. Testemunha	-----

Azo: Azoxistrobina; Ben: Benzovindiflupir; Tri: Trifloxistrobina; Pro: Protioconazol; Phi: Fosfito de Potássio; 4T: Quarto Trifólio; PT: Planta Toda

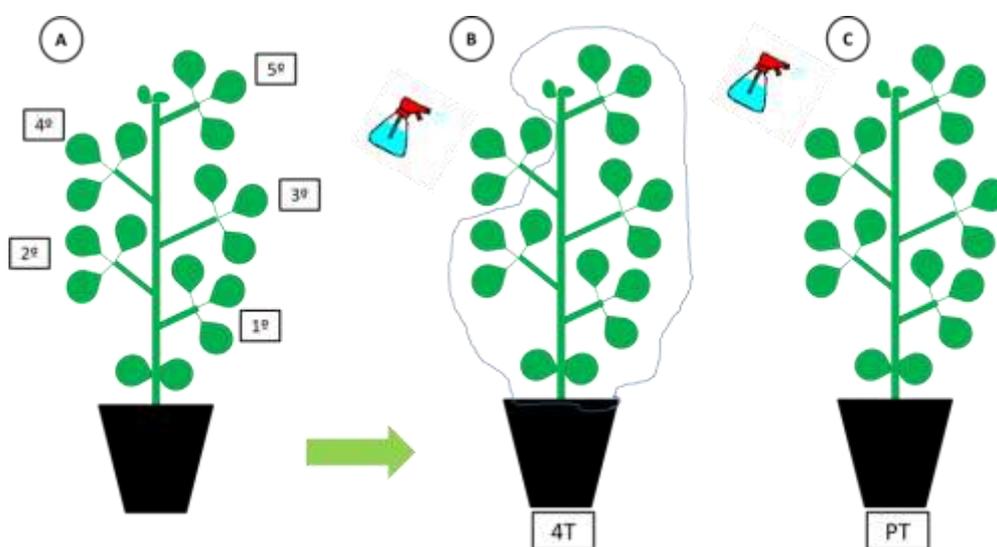
*Aplicados com Nimbus[®] ($1,0 \text{ L ha}^{-1}$)

** Aplicados com Assist[®] ($1,0 \text{ L ha}^{-1}$)

A aplicação dos produtos foi realizada quando as plantas atingiram o estágio V5 e de duas formas diferentes: somente no 4º trifólio contado da base para o ápice (4T) e na planta

toda (PT). Para a aplicação 4T, as plantas foram protegidas com sacos plásticos e somente o 4º trifólio expostos para a pulverização. Os tratamentos foram aplicados sobre as folhas com o auxílio de um borrifador manual até o ponto de escorrimento, sempre tomando o cuidado para que os demais trifólios e o solo não recebessem o produto. A proteção foi removida somente quando as folhas aplicadas se apresentaram totalmente secas. Na aplicação PT, as plantas foram totalmente pulverizadas até ponto de escorrimento (Figura 1).

Figura 1 - (A) Posição dos trifólios na planta; (B) Aplicação dos produtos somente no 4º trifólio; (C) Aplicação dos produtos na planta toda.



Fonte: Do autor (2018).

As plantas foram infectadas naturalmente pelo fungo oídio (*Microsphaera diffusa*) que foi utilizado como indicador biológico. As avaliações da severidade da doença foram realizadas semanalmente, após a aplicação dos produtos, totalizando cinco avaliações, com a utilização da escala diagramática proposta por Polizel & Juliatti (2010). Foram avaliados separadamente os trifólios um, dois, três para comparar em cada um deles o progresso da doença e se houve ação dos produtos aplicados. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, com quatro repetições e cada parcela foi constituída por um vaso com duas plantas. Os dados coletados foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e os resultados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2011). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.2 Ensaio II – Translocação de fosfito em plantas de soja

2.2.1 Obtenção do material vegetal

Sementes de soja da cultivar N 5909 RR (Nidera), foram semeadas em vasos de polietileno (3,5 dm³) contendo somente substrato comercial Carolina Soil (pH = 5,5; CE = 0,7; Densidade 145 Kg m⁻³; CRA 55%; Umidade Máxima 50%). Os vasos foram irrigados somente com água deionizada até o lançamento do primeiro trifólio, que ocorreu 20 dias após a semeadura. A partir deste período, a irrigação foi complementada com a utilização de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), duas vezes por semana. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil até a coleta do material.

2.2.2 Aplicação dos tratamentos e coleta do material para análise química

Os produtos utilizados foram o fungicida Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Azo + Ben), selecionado a partir do resultado do ensaio de severidade do item 2.1 e o produto Fosfito de Potássio (Phi). As doses utilizadas foram às recomendadas pelo fabricante e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Tratamentos e doses utilizados no ensaio em casa de vegetação

Tratamentos	Dose
1. Azo + Bem 2T*	0,2 Kg ha ⁻¹
2. Phi 2T	0,5 L ha ⁻¹
3. Azo + Bem + Phi 2T*	0,2 Kg ha ⁻¹ + 0,5 L ha ⁻¹
4. Azo + Bem PT*	0,2 Kg ha ⁻¹
5. Phi PT	0,5 L ha ⁻¹
6. Azo + Bem + Phi PT*	0,2 Kg ha ⁻¹ + 0,5 L ha ⁻¹
7. Testemunha	-----

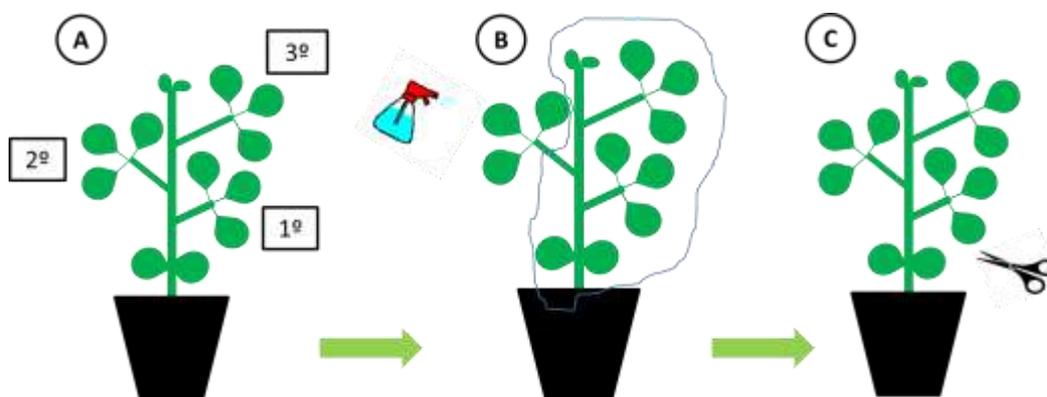
Azo: Azoxystrobin; Ben: Benzovindiflupyr; Phi: Fosfito de Potássio; 2T: Segundo Trifólio

*Aplicados com Nimbus® (1,0 L ha⁻¹)

A aplicação dos produtos foi realizada quando as plantas atingiram o estágio V3 e de duas formas diferentes: somente no 2º trifólio contado da base para o ápice (2T) e na planta toda (PT). Para a aplicação 2T, as plantas foram protegidas com sacos plásticos e somente o

2º trifólio foi exposto para a aplicação dos produtos (Figura 2). Em cada trifólio foi aplicado, com o auxílio de um borrifador, 0,9 mL da solução de cada tratamento sempre tomando o cuidado para que os demais trifólios e o solo não recebessem o produto. A proteção foi retirada das plantas somente quando as folhas se apresentaram totalmente secas. Na aplicação PT, foram pulverizados 8 mL da solução de cada tratamento sobre toda a planta até ponto de escorrimento. A concentração de fosfito aplicada foi 36,8 mM por planta. O delineamento experimental foi blocos casualizados, com quatro repetições e cada parcela foi constituída por 3 vasos com 4 plantas.

Figura 2 - (A) Posição dos trifólios na planta; (B) Aplicação dos produtos somente no 2º trifólio; (C) Coleta dos trifólios.



Fonte: Do autor (2018).

Após 24 horas da aplicação, foram coletados separadamente os primeiros, segundos e terceiros trifólios de cada planta, com o auxílio de uma tesoura (Figura 2). Cada amostra foi constituída por 12 trifólios. As folhas foram armazenadas em sacos de papel kraft identificados e encaminhados ao Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

2.2.3 Determinação de fósforo/fosfito pelo método colorimétrico

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Foliar, do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. A concentração de fósforo/fosfito foi determinada pelo método colorimétrico após digestão ácida do tecido foliar (incineração). Durante o processo de extração ocorre a retirada dos elementos de compostos orgânicos ou adsorvidos a estes compostos. O método se baseia na formação de um composto amarelo do sistema vanadomolibdofosfórico em acidez de 0,2 a 1,6 M (MALAVOLTA et al., 1997).

Neste procedimento, as folhas coletadas foram lavadas por alguns segundos em água de torneira e enxaguadas com água destilada em porções sucessivas. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de 65 a 70 °C até peso constante. Após este processo, as amostras foram moídas em moinhos do tipo Wiley, peneiradas em peneiras de 20 mesh (1mm) e armazenadas em vidros com tampa plástica devidamente identificados.

No processo de extração, foram pesados 0,5 g da amostra no tubo de digestão e adicionado 6 mL da mistura de ácido nítrico (HNO₃) e ácido perclórico (HClO₄) na proporção de 2:1 (v/v). Em seguida, as amostras foram levadas para bloco digestor onde a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 160 °C e mantida a essa temperatura por 40 min até o volume ser reduzido a metade. Em seguida, a temperatura foi elevada para 210 °C e mantidas por 20 min até obter fumos brancos de HClO₄ e o extrato apresentar-se incolor. Após as amostras esfriarem, foram adicionados ± 18 mL de água destilada e pesado o volume final.

Para a determinação do fósforo total, o primeiro passo foi a obtenção de uma curva analítica. Foram pipetados em frascos com tampa, 10 mL das soluções padrão de fosfato (a prova em branco ou solução 0,0 mg/Kg de P correspondente a 10 mL de água destilada). Em seguida foram adicionados 4,0 mL do reativo colorido (molibdato de amônio 5% e metavanadato de amônio 0,25%) e homogeneizado até o desenvolvimento de cor amarela. A solução ficou em repouso por 5 min, e após procedeu-se às leituras a 420 nm. Dos resultados obtidos, foi elaborado um gráfico dos padrões versus concentração de fósforo neles (HARRIS, 2001).

A determinação do fósforo total foi realizada transferindo uma alíquota de 1 mL do extrato nítrico-perclórico obtido da extração para frascos de vidro e adicionado 9 mL de água destilada. Foram adicionados 4 mL de um reativo colorido (molibdato de amônio 5% e metavanadato de amônio 0,25%), homogeneizado até o desenvolvimento de cor amarela. A solução ficou em repouso por 5 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm.

A transformação para fosfito foi feita descontando o valor de fósforo total das amostras em cima do valor de fósforo total das testemunhas. Foram adicionadas nas amostras concentrações conhecidas de fosfito e fungicida. Assim os valores foram expressos em concentração de fosfito (mM). Os resultados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2011). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.2.4 Método teórico - Análise da interação fungicida-fosfito e sua influência no carregamento do Benzovindiflupir e Azoxistrobina em plantas

As estruturas dos fungicidas Benzovindiflupir (Ben) e Azoxistrobina (Azo), assim como a estrutura molecular do fosfito (Phi), foram obtidas computacionalmente por meio de cálculos de otimização à luz da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) utilizando o software Gaussian. Os cálculos foram realizados com o funcional M06-2X e função de base 6-311++g(d,p). O ambiente de solvatação foi simulado utilizando o modelo contínuo polarizável SMD2.

Para investigar a interação entre os fungicidas (F) e o fosfito (Phi), foram considerados três sistemas complexantes: azoxistrobina + fosfito (Azo_Phi), solatenol + fosfito (Sol_Phi) e azoxistrobina + solatenol + fosfito (Azo_Sol_Phi). A energia de interação (ΔE_{FP}) foi obtida utilizando a equação (1), tal que E_{FP} é a energia do complexo fungicida + fosfito (FP) em sua geometria de energia mínima, E_F é a energia do fungicida em sua própria geometria e E_P é a energia do fosfito em sua própria geometria. Todos os cálculos foram realizados em meio aquoso.

$$\Delta E^{FP} = E_{FP} - (E_F + E_P) \quad (1)$$

A análise dos dados foi dada de forma comparativa calculando-se a energia de interação relativa ($\Delta \Delta E$), vide a equação (2), tal que a energia de interação ΔE_{FP} é diminuída por uma energia de interação referência $\Delta E_{FP}^{Referência}$. Esta energia de interação referência é o ΔE_{FP} do sistema complexante mais estável, de tal forma que $\Delta \Delta E$ mensura a diferença de estabilidade entre os complexos FP.

$$\Delta \Delta E = \Delta E^{FP} - \Delta E_{Referência}^{FP} \quad (2)$$

De forma análoga às equações (1) e (2), foram calculadas as energias livres de Gibbs padrão de interação relativa ($\Delta \Delta^\circ G$) à 2°C, por meio dos modos vibracionais dos sistemas considerados. Ademais, as energias livres de Gibbs padrão de solvatação foram obtidas de acordo com a equação (3) a partir das energias livres de Gibbs em meio aquoso e no vácuo.

$$\Delta^\circ G_{solv} = G_{\text{água}} - G_{\text{vácuo}} \quad (3)$$

Para avaliar a capacidade de difusão dos fungicidas e dos complexos através de meios com diferentes polaridades, foram calculadas suas lipofilicidades ($\log Kow$) utilizando a equação (4) a partir das energias livres de Gibbs em água e em 1-octanol à 25°C (PIEŃKO et al., 2016).

$$\log Kow = -(G_{1-octanol} - G_{\text{água}})/2,303RT \quad (4)$$

A lipofilicidade também foi mensurada de forma relativa (eq. 5), tal que $\Delta \log Kow$ mostra a diferença de lipofilicidade entre os sistemas estudados.

$$\Delta \log Kow = \log Kow - \log Kow_{\text{referência}} \quad (5)$$

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio I – Severidade do oídio em soja

As menores AACPD na severidade do oídio foram obtidas pelos tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Azo + Ben) PT e Trifloxistrobina + Proticonazol (Tri + Pro) PT, com porcentagens de controle médias acima de 80%. Quando aplicados somente no quarto trifólio, houve diferença estatística entre os tratamentos nos trifólios um e dois. Em ambos, os tratamentos compostos por Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio (Phi) 4T e Trifloxistrobina + Proticonazol + Fosfito de Potássio 4T proporcionaram diminuição da AACPD quando comparados à testemunha, com porcentagem de controle de 33,28% e 43,98% para Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio 4T e 36,49% e 50,97% para Trifloxistrobina + Proticonazol + Fosfito de Potássio 4T nos trifólios um e dois respectivamente. Nos demais trifólios não houve diferença quando comparados à testemunha (Tabela 3).

Tabela 3- Efeito dos tratamentos na severidade de oídio em soja nos diferentes trifólios. Médias com mesma letra nas colunas não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

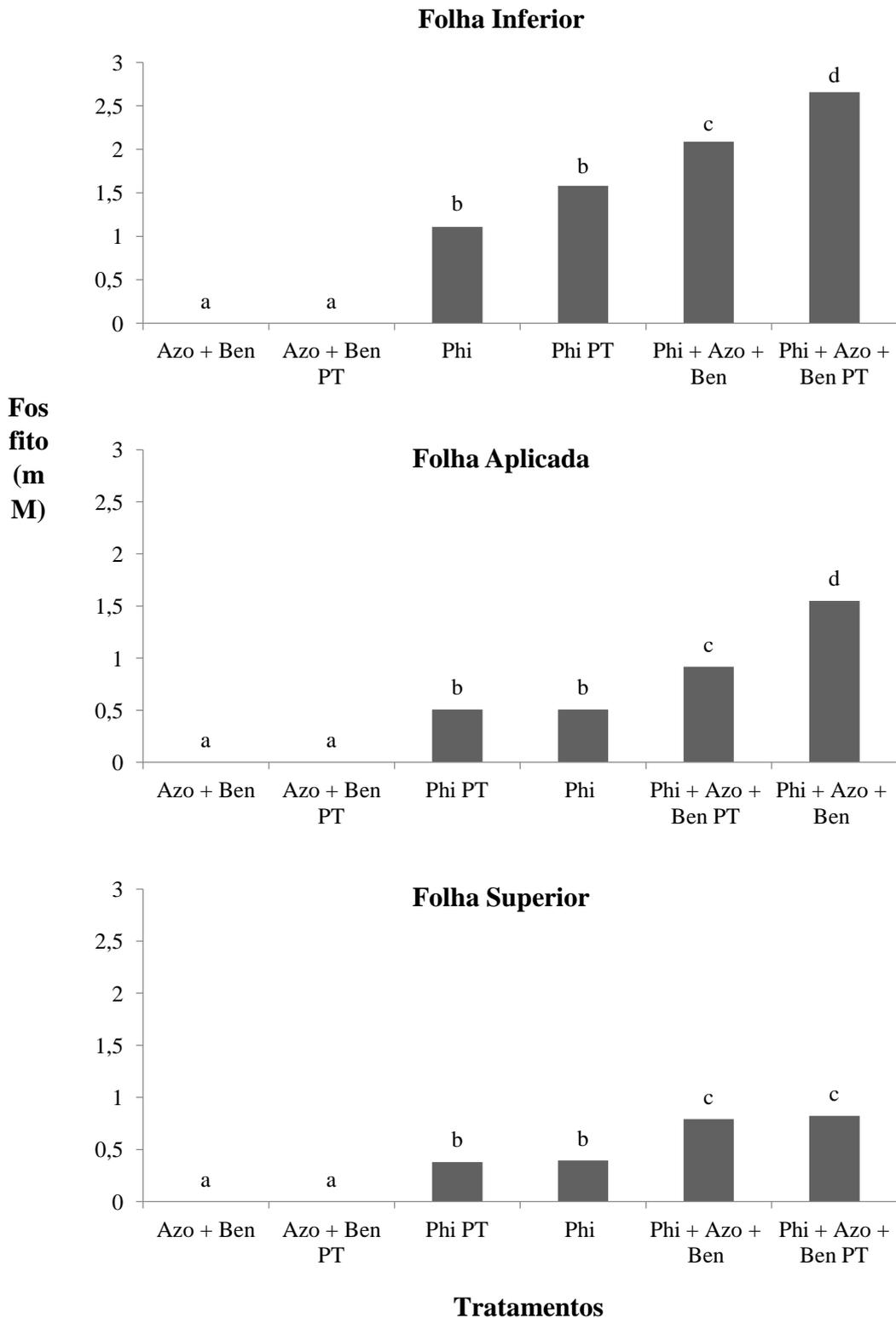
AACPD						
Tratamento	Trifólio 1	Trifólio 2	Trifólio 3	Trifólio 4	Trifólio 5	Total
Azo + Ben + Phi 4T	739,0b	626,1c	478,3b	33,3a	203,1b	382,5 b
Azo + Ben 4T	1041,9c	838,8d	376,4b	0,0a	161,7b	442,2b
Azo + Ben PT	283,3a	21,9a	129,2a	21,9a	21,1a	61,7a
Tri + Pro + Phi 4T	620,5b	483,3b	727,7b	5,7a	225,4b	387,5b
Tri + Pro 4T	935,9c	821,4d	477,9b	0,0a	225,8b	473,4b
Tri + Pro PT	184,3a	101,1a	16,3a	10,6a	17,1a	24,5a
Testemunha	1107,8d	985,9e	450,7b	226,3a	204,3b	592,7c
CV						56,8

Azo: Azoxistrobina; Ben: Benzovindiflupir; Tri: Trifloxistrobina; Pro: Protiocoazol; Phi: Fosfito de Potássio; 4T: Quarto Trifólio; PT: Planta Toda

3.2 Ensaio II – Translocação de fosfito em plantas de soja

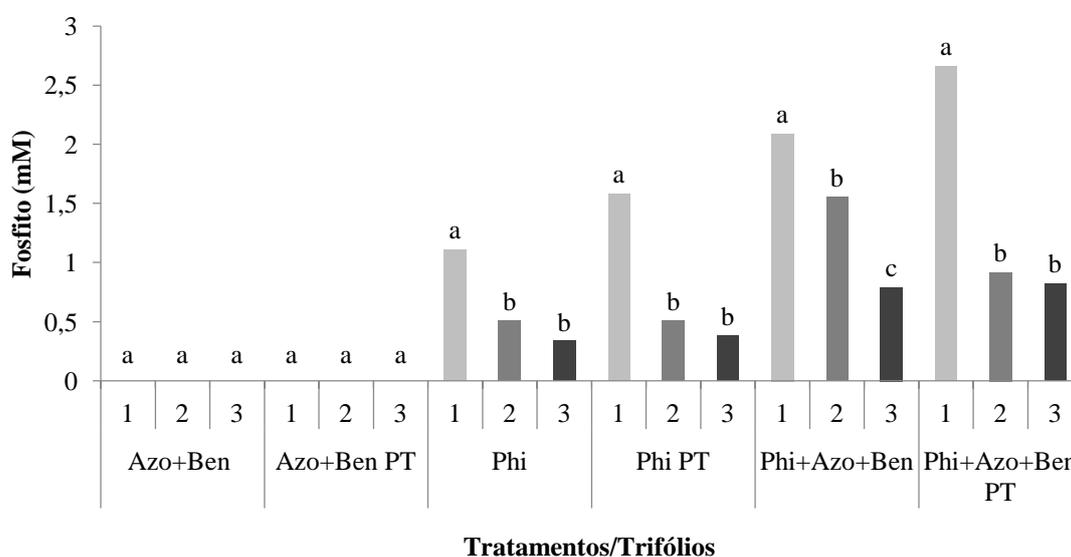
O fosfito foi detectado em amostras de folhas 24 horas após a aplicação dos tratamentos contendo Fosfito de Potássio. A concentração estimada nos tecidos das plantas ficou entre 0,3 e 3 mM. Em todas as folhas analisadas, inferior, aplicada e superior, houve diferença estatística entre os tratamentos, e as associações entre fungicida e fosfito promoveram aumento nas concentrações em todos os trifólios. Nas amostras onde foi aplicado somente o fungicida, não houve detecção de fosfito (Figura 3).

Figura 3 – Análise de fosfito em folhas superiores, aplicadas e inferiores de plantas de soja. Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir) Tri (Trifloxistrobina); Pro (Protioconazol); Phi (Fosfito de Potássio); PT (Planta Toda). Médias com mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Quando as concentrações de fosfito são comparadas entre as folhas de um mesmo tratamento, nota-se em todas as folhas inferiores, uma maior concentração e desta forma fica mais evidente que a associação entre fosfito e fungicida promoveu um aumento na translocação descendente deste ânion na planta.

Figura 4 - Concentração de fosfito nos diferentes Trifólios: 1- Folha Inferior; 2- Folha Aplicada; 3- Folha Superior. Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir) Tri (Trifloxistrobina); Pro (Protioconazol); Phi (Fosfito de Potássio); PT (Planta Toda). Médias com mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



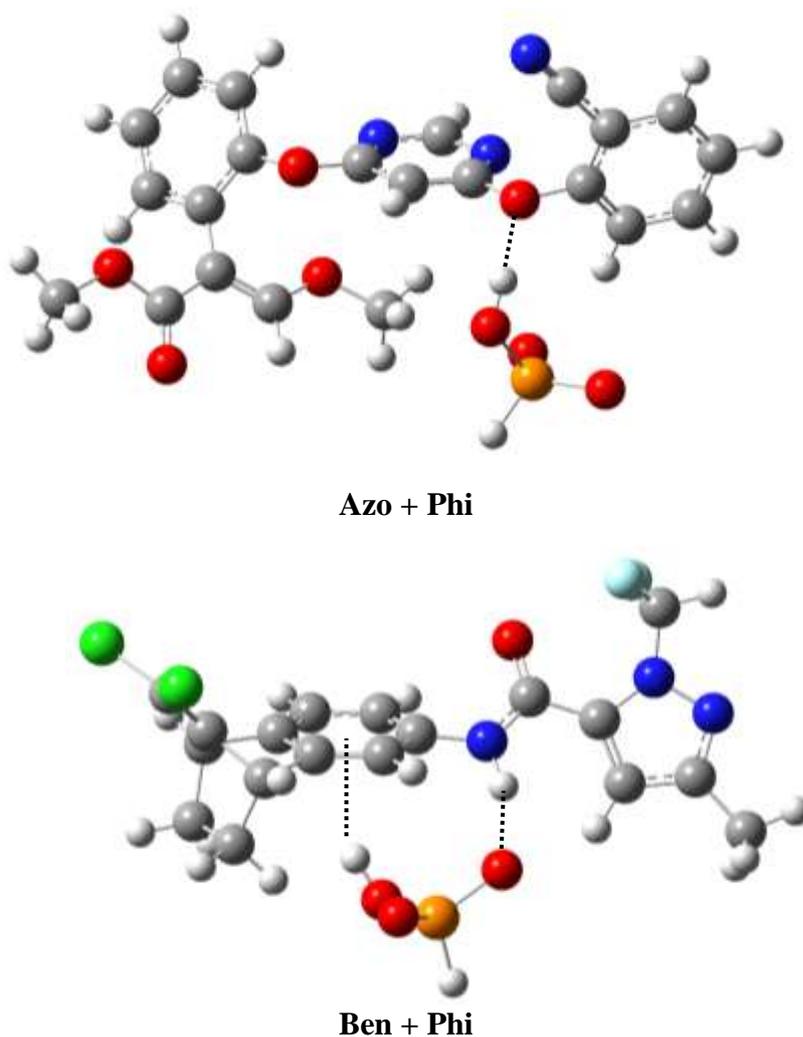
3.3 Interação fungicida-fosfito e sua influência no carregamento do solatenol e azoxistrobina em plantas

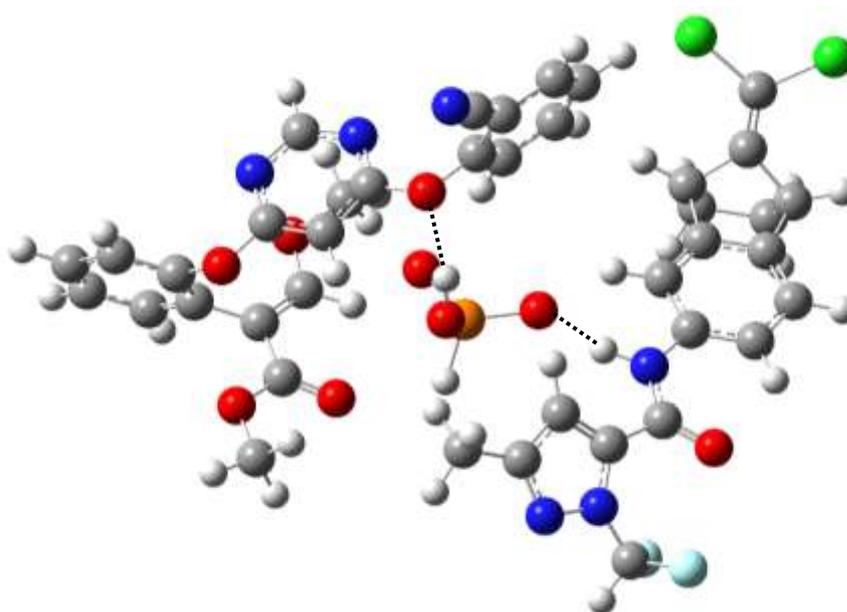
A Figura 5 ilustra a geometria obtida teoricamente dos complexos fungicida + fosfito. É importante ressaltar que o fosfito é uma estrutura aniônica com carga -1 e possui três oxigênios em sua constituição, que são átomos eletronegativos. Dessa forma, os hidrogênios deverão ter densidade de carga positiva enquanto seus oxigênios terão densidade de carga negativa, principalmente aqueles ligados apenas ao átomo de fósforo. Perante isto, nota-se que o fosfito é um bom candidato a ser um aceptor de ligação de hidrogênio, ou seja, ele pode interagir fortemente com hidrogênios pobres em densidade eletrônica por meio de seus átomos de oxigênios com alta densidade eletrônica. Contudo, existe também a possibilidade de o fosfito agir como um doador de ligação de hidrogênio por meio do hidrogênio da

hidroxila, embora possibilite uma interação mais fraca devido à sua condição de molecular aniônica.

O fungicida Azoxistrobina (Azo) não possui hidrogênios pobres em densidade eletrônica, sendo assim um mal doador de ligação de hidrogênio. Entretanto, possui vários sítios negativos e um deles foi capaz de interagir com o hidrogênio da hidroxila do fosfito. O fungicida Benzovindiflupir (Ben) é um bom doador de ligação de hidrogênio por ter um hidrogênio ligado à um nitrogênio. Dessa forma, os cálculos teóricos apontaram uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do fosfito e o grupo NH do Benzovindiflupir, além de uma interação atrativa entre a ligação O-H do fosfito com o anel aromático do Benzovindiflupir. Em um sistema composto por ambos os fungicidas (Azo + Ben), ambas as ligações de hidrogênio descritas anteriormente prevaleceram.

Figura 5 - Estruturas moleculares obtidas computacionalmente para os complexos fungicidas + fosfito.





Azo + Ben + Phi

Tabela 4 - Energias de interação relativa ($\Delta\Delta E$), energias livres de Gibbs padrão de interação relativa ($\Delta\Delta^\circ G$), energias livres de Gibbs padrão de solvatação ($\Delta^\circ G_{\text{solv}}$) e lipofilicidade relativa ($\Delta\log K_{\text{ow}}$) para os sistemas estudados. Valores de energia em kcal.mol^{-1} . Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)

Sistema	$\Delta\Delta E$	$\Delta\Delta^\circ G$	$\Delta^\circ G_{\text{solv}}$	$\Delta\log K_{\text{ow}}$
Phi	-	-	1,23	-7,66
Azo	-	-	57,48	0,00
Ben	-	-	61,96	2,37
Azo + Phi	8,71	3,39	0,00	-6,78
Ben + Phi	5,20	0,00	16,01	-2,87
Azo + Bem + Phi	0,00	10,56	15,09	-2,34

A Tabela 4 mostra os valores das energias livres de Gibbs padrão de solvatação ($\Delta^\circ G_{\text{solv}}$) e lipofilicidade relativa ($\Delta\log K_{\text{ow}}$) para todos os sistemas avaliados e os valores das energias de interação relativa ($\Delta\Delta E$) e energias livres de Gibbs padrão de interação relativa ($\Delta\Delta^\circ G$) para os complexos fungicida + fosfito. Os cálculos teóricos para $\Delta\Delta E$ sugerem que o complexo Azo + Ben + Phi faz as interações mais fortes eletronicamente. Uma vez que são observadas duas ligações de hidrogênio neste sistema, suas interações são $5,20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mais fortes do que as observadas em Ben + Phi e $8,71 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mais fortes que as observadas em Azo + Phi.

Contudo, os resultados em $\Delta\Delta^\circ G$ mostraram que a interação entre o Benzovindiflupir e o fosfito (Ben + Phi) é cerca de $3,50 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mais forte que a interação entre o

Azoxistrobina e o fosfito (Azo + Phi). Isto provavelmente se deve ao fato de o fosfito ser melhor aceptor de ligação de hidrogênio do que um doador, e o Benzovindiflupir é o melhor doador de ligação de hidrogênio entre os dois fungicidas. Apesar da alta estabilidade prevista pelo $\Delta\Delta E$, os cálculos teóricos também sugerem que a possibilidade do fosfito interagir com os dois fungicidas ao mesmo tempo é termodinamicamente improvável (Azo + Ben + Phi), cerca de $10,50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ mais instável que o Ben + Phi e cerca de $7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ mais instável que o Azo + Phi.

Contudo, os cálculos teóricos mostram que o complexo Azo + Phi é o sistema mais solúvel em água. Para os monômeros em questão, o fosfito é a espécie mais solúvel, enquanto os fungicidas possuem $\Delta^\circ G_{\text{solv}}$ mais de $50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ maior. Entretanto a importância desses resultados é que a interação com o fosfito é capaz de aumentar drasticamente a solubilidade dos fungicidas. Além do $\Delta^\circ G_{\text{solv}}$ para o Azo + Phi ser o menor entre eles, diminuindo cerca de $57 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ do $\Delta^\circ G_{\text{solv}}$ do Azoxistrobina, a energia livre de Gibbs padrão de solvatação do Benzovindiflupir diminui em cerca de $46 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ao interagir com o fosfito.

Em relação à lipofilicidade dos fungicidas, o $\log K_{ow}$ da azoxistrobina é estimado em 2,5, segundo a Syngenta. O $\log K_{ow}$ estimado para o Benzovindiflupir é aproximadamente 4,00 – 4,22, segundo algumas plataformas (XLOGP3-AA e KOWWIN), cerca de 1,5 a 2,00 unidades maior do que o $\log K_{ow}$ do produto da Syngenta. Os cálculos teóricos estimam que o $\log K_{ow}$ para o Benzovindiflupir é 2,37 maior do que o estimado para o Azoxistrobina, sendo este o menor valor encontrado (Tabela 4). Portanto, esta estimativa é relativamente assertiva em relação às predições já estabelecidas. Ademais, os cálculos predizem que a lipofilicidade diminui cerca de 7 unidades para o Azoxistrobina e cerca de 4 unidades para o Benzovindiflupir, quando os fungicidas interagem com o fosfito. Esta diferença na lipofilicidade pode ser explicada pelo $\Delta^\circ G_{\text{solv}}$, tal que o sistema mais solúvel em água tende a ser o menos lipofílico.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiu analisar a translocação sistêmica de fosfito na presença ou não de fungicida em plantas de soja. O primeiro passo foi analisar a severidade do oídio em folhas abaixo das aplicadas. Neste caso, pode-se notar redução na AACPD e as porcentagens de controle nos primeiros trifólios foram de 33,28% e 43,98% para os tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio 4T e Trifloxistrobina + Proticonazol + Fosfito de Potássio 4T respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos

no segundo trifólio e as porcentagens de controle foram 36,49% e 50,97% para Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio 4T e Trifloxistrobina + Proticonazol + Fosfito de Potássio 4T respectivamente. Trabalhos comprovam a eficiência de fosfito aplicado via parte aérea no controle de diversas doenças, principalmente as radiculares, causadas por Oomicetos. Em batata, aplicações de fosfito via foliar foram capazes de inibir o crescimento de *Phytophthora infestans* devido ao acúmulo dos íons nos tubérculos, diminuindo a incidência da doença (BORZA et al., 2014; BORZA et al., 2016). Na África do sul na cultura do abacate, o fosfito é aplicado via injeção de tronco, duas vezes ao ano para o controle de doenças radiculares como a causada por *Phytophthora cinnamomi*, com obtenção de resultados satisfatórios (McLEOD et al., 2018). Além dos Oomicetos, os fosfitos tem apresentado bons resultados no controle de doenças causadas por patógenos não pertencentes a este grupo, como por exemplo, *Colletotrichum sp.* em feijão (SILVA et al., 2015; COSTA et al., 2017), *Phoma costarricensis* em café (NOJOSA et al., 2009) e *Alternaria alternata* em macieira (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003).

O fosfito é considerado um análogo ao fosfato, devido as suas similaridades estruturais. No entanto, o fosfito não é incorporado a compostos orgânicos, pois este composto não pode ser reduzido a fosfato dentro da planta (DALIO et al., 2012; GUEST; GRANT, 1991; McDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001). Estudos indicam que os fosfitos, quando aplicados nas plantas, é sistemicamente translocados via xilema e floema e segue uma relação fonte-dreno entre os vários pontos de crescimento, tais como raízes, folhas e frutos (DANOVA-ALT et al., 2008; GUEST; PEGG; WHILEY, 1995). No presente trabalho, pode constatar a presença de fosfito em todos os trifólios analisados. Porém os trifólios inferiores apresentaram maiores concentrações de fosfito, indicando maior translocação via floema deste composto.

Os fungicidas quando aplicados nas plantas precisam vencer várias barreiras, como por exemplo a cutícula, para que consiga penetrar nos tecidos foliares. Esta absorção esta associada a vários fatores, destacando a solubilidade em água e lipofilicidade dos compostos sendo as mais importantes (WANG; LIU, 2007). Após ser absorvido pelos tecidos, as moléculas são translocadas com redistribuição translaminar/local ou atingem os vasos de xilema, podendo ser levadas a longas distancias do local de aplicação de forma ascendente. Neste caso, a lipofilicidade é a propriedade física mais crítica para a redistribuição dentro dos tecidos vegetais. Esta lipofilicidade esta relacionada com um parâmetro denominado *logKow*, e os valores ideais para que ocorra mobilidade são os inferiores a 3 (KLITTCH, 2014). O produto Azoxistrobina + Benzovindiflupir, utilizado neste trabalho, possui uma mistura de

dois grupos químicos de fungicidas, a estrobilurina (Azoxistrobina) e a carboxamida (Benzovindiflupir) e segundo o fabricante, apresentam $\log K_{ow}$ em torno de 2,5.

Um modelo teórico foi elaborado para demonstrar a interação entre as moléculas de fosfito e fungicida e seu possível comportamento no interior da planta. Os cálculos teóricos à luz da Teoria do Funcional de densidades aplicados à investigação da interação entre os Azoxistrobina e Benzovindiflupir e o fosfito, mostraram que o Benzovindiflupir é capaz de realizar interações mais fortes. Além do mais, a interação com o fosfito é capaz de aumentar drasticamente a solubilidade dos fungicidas em água. Este aumento leva a uma diminuição de sua lipofilicidade, podendo atingir valores negativos. Tal fato implica na diminuição da capacidade de difusão dos fungicidas através de membranas ao se complexarem com o fosfito o que facilitaria a sua mobilidade. Isto seria vantajoso, pois os fosfitos seriam capazes de carrear as moléculas do fungicida para partes onde não ocorreu deposição do produto e aumentar a capacidade de proteção das plantas.

Outro fato interessante ocorrido, foi o aumento da concentração de fosfito na presença do fungicida em todos os trifólios analisados. Isto provavelmente ocorreu devido à interação entre as moléculas provocar uma maior solubilidade causando uma maior translocação e acúmulo do fosfito nos tecidos foliares.

O acúmulo de fosfito na planta é vantajoso e pode exercer efeitos fungitóxicos contra vários fitopatógenos. Segundo Stasikowski et al. (2014), a concentração mínima acumulada nos tecidos das plantas necessária para exercer esse efeito tóxico ficaria acima de 1mM. Este fato foi comprovado por Costa et al. (2017) onde a concentração de 1mM foi capaz de reduzir o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum lindemutianum*. Em batata, análises revelaram que a concentração de fosfito, quando aplicados via foliar, em tubérculos foram em média 1,9 mM e esta concentração foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Phytophthora infestans*. No presente trabalho, todos os tratamentos contendo fosfito nas folhas inferiores e a associação entre fosfito e fungicida na folha aplicada, apresentaram concentrações superiores a 1mM que provavelmente contribuíram para a redução da severidade da doença. Perante o exposto, pode-se inferir que a presença do fungicida aumenta a translocação basipetal do fosfito quando aplicado via foliar.

5 CONCLUSÃO

1. A associação entre fosfito e fungicida promove controle da doença em folhas baixas;
2. Fosfitos quando aplicados associados a fungicidas promovem um maior acúmulo de fosfito nas partes mais baixas da planta;
3. Na hipótese que o carreamento dos fungicidas ocorra através dos vasos condutores das plantas, o fosfito irá contribuir fortemente para este fenômeno e terá preferência para complexar com o Benzovindiflupir, embora sua interação com o Azoxistrobina também seja relevante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiar esse estudo, Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Laboratório de Análise Foliar e Laboratório de Modelagem Molecular da UFLA pelo suporte na execução dos trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, L.A.S. de. **Fungicidas sistêmicos: Teoria e Prática**. 1. ed. Campinas: EMOPI, 2007, 284p.
- BORZA, T. et al. Phosphite uptake and distribution in potato tubers following foliar and postharvest applications of phosphite-based fungicides for late blight control. **Annals of Applied Biology**, p.1-13, 2016.
- BORZA, T. Ion chromatography analysis of phosphite uptake and translocation by potato plants: Dose-dependent uptake and inhibition of *Phytophthora infestans* development. **Crop Protection**, v. 56, p. 74-81, 2014.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento - file:///C:/Users/-098yr4w/Downloads/BoletimZGraosZnovembroZ2018.pdf - Acesso em 10/11/2018.
- COSTA, B.H.G. et al. Potassium phosphite in the protection of common beans plants against anthracnose and biochemical defense responses. **Journal of Phytopathology**, p.1-8, 2017.
- DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.
- DANOVA-ALT, R. et al. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells kinetics and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. **Plant Cell and Environment**, v. 31, p. 1510-1521, 2008.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GÓMEZ-MERINO, F.C.; TREJO-TÉLLZ, L.I. Biostimulant activity os phsphite in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 82-90, 2015.

GUEST, D. I.; PEGG, K. G.; WHILEY, A. W. Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk injected phosphonates. **Horticultural Reviews**, v. 17, p. 299-330, 1995.

GUEST, D.; GRANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 66, p. 159-187, 1991.

HANSCH, C.; FUJITA, T. p-s-pi Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. **J. Am. Chem. Soc. Washington**, v. 86, p. 1616, 1964.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 5 ed. Rio de Janeiro, p.861, 2001.

JUHÁSZ, A.C.P.; PÁDUA, G.P.; WRUCK, D.S.M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO N.R. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, v.34, n.276, p.66-75, 2013.

KLITTICH, C.J.R.; RAY, S.L. Effects of physical properties on the translaminar activity of fungicides. **Pesticide Biochemistry an Physiology**, v. 107, p. 351-359, 2013.

KLITTICH, C.J.R. Fungicide Mobility and the Influence of Physical Properties. In: **Retention, Uotake and Translocation of Agrochemicals in Plants**. 2014. Cap 5, p.95-109, 2014.

KUBINYI, H. QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches, v. 1. **Edited by R.Mannhold, P.Krosgaard-Larsen, and H.Timmerman**. Weinheim: VCH, 1993.

LOMBARDO, F., et al., in MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction, Weinheim: Wiley-VCH, v. 37, cap. 16, p. 407-430, 2008.

LOVATT, C. J. & MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, v. 90, p.1-11, 2006.

MACHINANDIARENA, M. F. et al. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, p. 1417-1424, 2012.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2 ed. Piracicaba, p.319, 1997.

MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. J. **Phys. Chem. B**, v.113, n.18, p.6378-6396, 2009.

MARTEL, S.; GILLERAT, F.; CAROSATI, E.;MAIARELLI, D.; TETKO, I. V.; MANNHOLD, R.; CARRUPT, P.A. Large, chemically diverse dataset of logP measurements

for benchmarking studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 21–29, 2013.

McDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, v. 24, p. 1505-1519, 2001.

McLEOD, A. et al. Quantification of root phosphite concentrations for evaluating the potential of foliar phosphonate sprays for the management of avocado root rot. **Crop Protection**, v.103, p.87-97, 2018.

NEVES, J. S. Influência da aplicação de fosfito de potássio na severidade da ferrugem asiática da soja. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

PIENKO, T.; GRUDZIENI, M.; TACIAK, P. P.; MAZUREK, A. P. J. **Mol. Graph. Model.**, v.63, p.15-21, 2016.

POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C. Quantificação de doenças foliares da soja por escalas diagramáticas. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, p.1-9, 2010.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; REIS, A. C. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. Florianópolis: Insular, 2007. 176 p.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by aminobutyric acids and potassium phosphates. **Plant Disease**, v. 87, p. 933-9366, 2003.

SILVA, O.C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, v.30, p.598-604, 2011.

SILVA, J. L. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, n. 8, p. 243-253, 2015.

SCHROETTER, S.; ET AL. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). **Landbauforschung Volkenrodxe**, v. 56, p. 87-99, 2006.

STASIKOWSKI, P. et al. A direct chemical method for the rapid, sensitive and cost effective detection of phosphite in plant material. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 115-121, 2014.

TAYLOR, P. J. Hydrophobic properties of drugs, p. 241, in HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B. **Comprehensive Medicinal Chemistry**, v. 4, Oxford: Pergamon Press, 1990.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides- present status and future challenge. **Pestic Biochem Physiol**, v.87, p.1-8, 2007.

**ARTIGO 2 - Fosfito de potássio associado a fungicida na proteção de plantas de soja –
Análises Moleculares e Bioquímicas**

¹Ariana Elisei Vilela et al.

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução do Manual
de Normalização da UFLA.

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG,
Brasil. Autor para correspondência: Ariana Elisei Vilela, e-mail: ae vilela@gmail.com

RESUMO

Os fosfitos são altamente utilizados no manejo de doenças da soja. Entretanto, o seu uso associado a fungicidas não é bem elucidado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação sistêmica do Fosfito de Potássio, aplicado de forma isolada ou em mistura com o fungicida sistêmico Azoxistrobina + Benzovindiflupir, na severidade do oídio, na expressão de genes e na atividade de enzimas de defesa. Os tratamentos foram aplicados somente em um trifólio da planta. Diferentes trifólios foram coletados para a avaliação do experimento. Foram avaliadas a expressão dos genes *LOX*, *PR3* e *PAL*, que codificam, respectivamente, enzimas lipoxigenase, ligada a rota do ácido jasmônico, quitinase e fenilalanina amônia-liase. Foram avaliados também, por meio da atividade de enzimas de defesa, a fenilalanina amônia-liase (*PAL*), peroxidase (*POX*), superóxido dismutase (*SOD*) e ascorbato peroxidase (*APX*). De acordo com os resultados obtidos pela severidade, somente os tratamentos fosfito de potássio isolado ou na presença de fungicida promoveu uma maior porcentagem de controle nas folhas inferiores. Porém, foi observado que todos os tratamentos avaliados promoveram a expressão dos genes e atividade das enzimas em todas as folhas avaliadas, comprovando a atividade de resposta de defesa sistêmica.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max*, indução de resistência, genes de defesa.

ABSTRACT

Phosphites are highly used in soybean disease management. Although, its use is associated with fungicides, It is not well understood. The present work will evaluate the systemic action of Potassium Phosphite, applied alone or in combination with the systemic fungicide Azoxystrobin + Benzovindiflupyr, on powdery mildew severity, gene expression and defense enzyme activity. The treatments were applied only to a plant trifoliolate. Different trifolies were collected for the evaluation of the experiment. The expression of LOX, PR3 and PAL genes encoding lipoxygenase enzymes, linked to the jasmonic acid route, chitinase and phenylalanine ammonia lyase, respectively, were evaluated. Phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) were also evaluated by defense enzyme activity. According to the results, only potassium phosphite treatments isolated, or in the presence of fungicide promoted a higher percentage of control in the lower leaves. However, it was observed that all evaluated treatments promoted gene expression and enzyme activity in all evaluated leaves, proving the systemic defense response activity.

KEY WORDS: *Glycine max*, resistance induction, defense genes.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) ganha cada vez mais importância na agricultura mundial. O Brasil segue como o segundo maior produtor, ficando atrás somente dos EUA (CONAB, 2018). São vários os fatores bióticos e abióticos capazes de interferir na sua produtividade, dentre eles as enfermidades se destacam, como o míldio, oídio, ferrugem asiática, antracnose entre outras, provocando perdas consideráveis na produção (JUHÁSZ et al, 2013). O manejo mais empregado para o controle de doenças é por meio da utilização de produtos químicos. Entretanto, o uso contínuo de fungicidas pode causar a seleção de patógenos resistentes de safra para safra (FRAC, 2017). Outro problema enfrentado é o fato da maioria das doenças se desenvolverem nos terços inferiores das plantas, onde o controle se torna mais difícil pelo fato da grande dificuldade das pulverizações alcançarem esta região das plantas (HENNING et al., 2014; PRADO et al., 2010). Uma alternativa que atente aos requisitos de eficiência é a utilização de indutores de resistência sistêmicos, aplicados isolados ou associados a fungicidas. Apesar de não evitar a doença, quando aplicados sozinhos, à maioria reduz a intensidade entre 20 a 85% (WALTERS; FOUNTAINE, 2009).

As plantas naturalmente se protegem contra o ataque de patógenos usando uma complexa gama de mecanismos, por meio de uma rede elaborada de sinais que resultam na expressão de respostas de defesa (WALTERS; FOUNTAINE, 2009). Entre elas, pode-se incluir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), considerada a primeira linha de respostas de defesa, a biossíntese de fitoalexinas, acúmulos de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e reforço da parede celular (HAMMERSCHMIDT, 1999). Os indutores de resistência são compostos naturais ou sintéticos que estimulam respostas de defesa semelhantes às observadas em interações incompatíveis resultando na chamada resistência induzida (DANIEL; GUEST, 2006). Esta resistência consiste na ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta e é em um fenômeno local ou sistêmico sendo efetivo contra uma ampla gama de fitopatógenos (VAN LOON et al. 1998).

Dentre os inúmeros agentes usados como indutor de resistência em plantas, destacam-se os fosfitos, e seus efeitos já foram comprovados em diversos patossistemas, como por exemplo, míldio em soja (SILVA et al., 2011), várias espécies de *Phytophthora* (LOBATO et al, 2011; BORZA et al., 2014; McLEOD et al., 2018), antracnose do feijoeiro (COSTA et al., 2017), fusariose e podridões em batata (LOBATO et al, 2011). Os fosfitos são obtidos por meio da neutralização do ácido fosforoso (H_3PO_3) por uma base forte, formando o fosfito seguido pelo nome da base (fosfito de potássio, cálcio, cobre e etc.). Possuem como principais

características alta solubilidade e mobilidade quando aplicados na planta, permitindo maior translocação pelos tecidos vegetais (DALIO et al., 2012). Sua ação sistêmica se dá pelo fluxo dos vasos lenhosos, isto é, via xilema e via floema (SCHROETTER et al., 2006). Estes compostos ativam diversos mecanismos distintos de defesa, por meio do aumento da transcrição de genes da via do ácido salicílico e do ácido jasmônico/etileno, síntese de fitoalexinas e compostos fenólicos, ativação de PR-proteínas e ainda proporcionam o aumento de lignina, fortificando as barreiras naturais dos tecidos (SAUTTER et al., 2008; CARMONA; SAUTUA, 2011; ESHRAGHI et al., 2011; DALIO et al., 2012). A ativação sistêmica de respostas de defesa via aplicação de fosfitos foram comprovadas em vários trabalhos, como por exemplo, em batata onde aplicações foliares de fosfito de potássio foram capazes de promover aumento na atividade das enzimas quitinase, peroxidase, polifenoloxidase e incrementos na síntese de fitoalexinas em tubérculos. Este fato pode estar relacionado a grande capacidade do fosfito translocar de forma descendente, ou seja, via floema (LOBATO et al., 2011).

Os fosfitos promovem respostas de defesa na planta, porém não existem trabalhos específicos relatando a sua ação sistêmica em plantas e se o fato de estar associado a um fungicida sistêmico proporciona um aumento da defesa em partes da planta onde não receberam o produto, principalmente o baixeiro. Os fungicidas sistêmicos, de maneira geral, translocam nas plantas de forma ascendente. Deste modo, esta hipótese foi proposta devido à possibilidade de interação entre as moléculas de fosfito e fungicida sistêmico, e estas serem translocadas via floema.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do fosfito de potássio isolado e associado a fungicida e a possível ação sistêmica destes produtos em diferentes trifólios de plantas de soja por meio da severidade do oídio (*Microsphaera diffusa*). Além disso, foram realizadas análises da expressão dos genes relacionados à rota do ácido jasmônico (*LOX*), à PR-proteína (*PR3*) e no metabolismo dos fenilpropanóides (*PAL*) e análises bioquímicas das enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (*PAL*), peroxidase (*POX*), superóxido desmutase (*SOD*) e ascorbato peroxidase (*APX*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação e no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

2.1 Obtenção do material vegetal

Sementes de soja da cultivar N5909 RR (Nidera) foram semeadas em vasos de polietileno (3,5 dm³) contendo somente substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças[®]. Cada vaso continha seis sementes e após a germinação foi realizado um desbaste deixando apenas quatro plantas por vaso. Durante todo o período experimental, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, irrigadas periodicamente e adubadas de acordo com a necessidade da cultura.

2.2 Tratamentos e aplicação dos produtos

Os produtos utilizados no ensaio foram o fungicida sistêmico Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Azo + Ben), o fertilizante foliar Fosfito de Potássio (Phi), e o indutor padrão de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM). As doses utilizadas foram às recomendadas pelos fabricantes e estão descritas na Tabela 1.

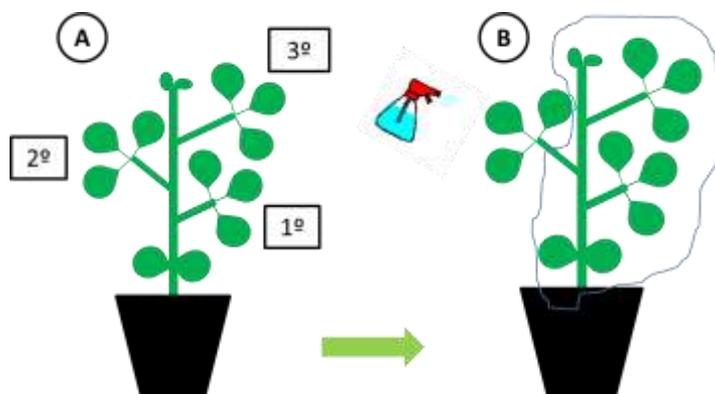
Tabela 1 - Tratamentos e doses utilizados no ensaio em casa-de-vegetação

Tratamentos	Dose
1. Azo + Ben	0,2 Kg ha ⁻¹
2. Phi	0,5 L ha ⁻¹
3. Azo + Bem + Phi	0,2 Kg ha ⁻¹ + 0,5 L ha ⁻¹
4. ASM	0,025 Kg ha ⁻¹
5. Testemunha	-----

Azo: Azoxystrobin; Ben: Benzovindiflupyr; Phi: Fosfito de Potássio; ASM: Acibenzolar-S-metil

Os produtos foram aplicados somente no 2º trifólio, contando da base para o ápice, quando as plantas atingiram o estágio V3. Para tal procedimento, as plantas foram protegidas com sacos plásticos e somente o 2º trifólio foi exposto para a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram aplicados sobre as folhas com o auxílio de um borrifador manual até o ponto de escorrimento, sempre tomando o cuidado para que os demais trifólios e o solo não recebessem o produto. A proteção foi retirada somente quando as folhas estavam totalmente secas (Figura 1).

Figura 1 - (A) Posição dos trifólios na planta; (B) Aplicação dos produtos somente no 2º trifólio.



Fonte: Do autor (2018).

Os tratamentos utilizados foram os mesmos para os ensaios de severidade e para as análises moleculares e bioquímicas, porém conduzidos separadamente.

2.3 Proteção de plantas de soja contra oídio

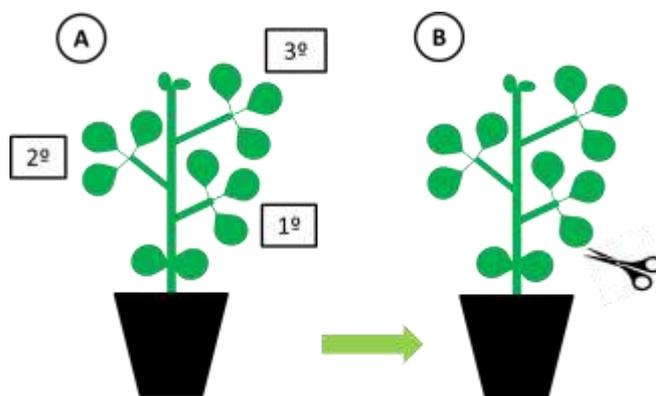
As plantas foram infectadas naturalmente pelo fungo causador do oídio da soja (*Microspora diffusa*) e já estava presente antes da aplicação dos tratamentos. As avaliações da severidade da doença foram realizadas semanalmente, a partir da aplicação dos produtos, totalizando cinco avaliações, utilizando-se a escala diagramática proposta por Polizel & Juliatti (2010). Foram avaliados separadamente os trifólios um, dois e três para comparar em cada um deles o progresso da doença. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados (DBC), com quatro repetições e cada parcela foi constituída por um vaso com duas plantas. Os dados coletados foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPD) e os resultados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2011). Quando significativo, as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

2.4 Coleta do material para análises moleculares e bioquímicas

As coletas foram realizadas nos tempos 0, 24, 72, 96 e 144 horas após a aplicação dos tratamentos. Foram coletados os trifólios 1, 2 e 3 separadamente, acondicionados em papel

alumínio e rapidamente congelados em nitrogênio líquido onde foram mantidos até serem armazenados em ultrafreezer (-80 °C) para as posteriores análises (Figura 2).

Figura 2 - (A) Posição dos trifólios na planta; (B) Coleta dos trifólios



Fonte: Do autor (2018).

Os tratamentos selecionados para as análises foram Fosfito de Potássio, Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio, Acibenzolar-S-metil e Testemunha. Neste caso, o tratamento Azoxistrobina + Benzovindiflupir não foi utilizado, pois se pretende avaliar a ação sistêmica da associação entre fosfito e fungicida sistêmico e não somente o fungicida. O ensaio foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com três repetições e duas plantas por repetição para cada tempo de coleta.

2.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

O tempo de coleta escolhido para a realização das análises foi 24h após a aplicação dos produtos. O material vegetal coletado foi macerado em nitrogênio líquido e, aproximadamente 0,24 g de cada amostra macerada foi utilizado para extração do RNA total. A extração foi realizada pelo método ConcertTM Plant RNA Reagent (Invitrogen), modificado. Para isso, adicionou-se nos tubos contendo o material vegetal, 600 µL de ConcertTM e, logo em seguida, foram homogeneizados em agitador e postos na horizontal durante 10 min em temperatura ambiente. Após o tempo, os tubos foram centrifugados por a 4°C em 14000 rpm por 6 min. Posteriormente, foram coletados 450 µL do sobrenadante e transferido para outro tubo contendo 100 µL de NaCl 5M. Ainda nestes tubos, foram adicionados 300 µL de clorofórmio, levados ao agitador por 1 min e centrifugados à 4 °C em 14000 rpm por 11 min. Em seguida, 420 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos contendo 100 µL

de NaCl 5M e adicionados novamente 300 µL de clorofórmio, agitados por 1 min e centrifugados à 4 °C em 14000 rpm por 11 min. A seguir, foram coletados 380 µL do sobrenadante, adicionados 380 µL de isopropanol e deixados overnight sob temperatura de -20 °C. Logo após esse período, os tubos foram centrifugados à 4 °C em 14000 rpm por 26 min. Na sequência, o sobrenadante foi descartado, e ao peleti foram adicionados 600 µL de etanol 75% e centrifugados novamente a 4 °C em 14000 rpm por 6 min. Esta etapa foi realizada duas vezes. Por fim, os tubos foram secos em câmara de fluxo e a eles foram adicionados 20 µL de água ultra-pura e armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed™, e as amostras quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

Posteriormente, para garantir a qualidade e apenas a presença de RNA, as amostras foram tratadas com DNASE, com o *Kit TURBO DNA-free*™ (Invitrogen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante, e novamente quantificadas em NanoVue™ Plus Spectrophotometer.

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o Kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram mantidas em -20 °C até o uso.

Os primers para análise da expressão gênica utilizados nesse estudo foram: *Fbox* - *F*: 5'-AGATAGGGAAATGGTGCAGGT-3'; *Fbox* *R*: 5'-CTAATGGCAATTGCAGCTCTC-3' e *ATPb* - *F*: 5'-GATCAGCAATTATGCACAACG-3'; *R*: 5'-CCGCCACCATCCAGATTATGT-3', utilizados como genes de referência na normalização da expressão gênica em soja, ambos desenhados por Libault et al. (2008). Os genes *Quitinase* - *PR3* *F*: 5'-GAAATTGTGTTCGGTGATGCT-3'; *PR3* *R*: 5'-CAGCTTGTGTGCCACATTG-3'; *Fenilalanina amônia-liases* - *PAL* *F*: 5'-TTGATCCACTTTTGGAAATGC-3'; *PAL* *R*: 5'-CACGTGTACAGAAAAGAAACCA-3' e *Lipoxigenase* - *LOX* *F*: 5'-TCCCAGAAGAAGGAACCAAA-3'; *LOX* *R*: 5'-GAAATGTCAATAAGGGTCTCG-3', utilizados como genes de defesa da planta.

Para análise da RT-qPCR, foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 FAST *Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e o sistema de detecção foi o *SYBR Green*. Para cada reação foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* a 10 µM e 5,0 µL de *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), para um volume final de amostra de 10 µL. A amplificação foi conduzida em incubações iniciais por 23 segundos a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95

°C e 15 segundos a 65 °C, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão.

Para cada gene em estudo, o experimento foi conduzido a partir de cDNAs obtidos de três repetições biológicas, com três replicatas técnicas, sendo os resultados normalizados, usando os CTs (Ciclo *Threshold*), obtidos somente pela expressão do gene constitutivo *Fbox*. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método CT comparativo (PFAFFL, 2001)

2.6 Análise da atividade enzimática

Foram realizadas análises enzimáticas para todos os tempos de coleta mencionados no item 2.4. As enzimas avaliadas foram Fenilalanina amônia-liases (PAL), Peroxidase (POX), Superóxido dismutase (SOD) e Ascorbato peroxidase (APX). Os extratos enzimáticos utilizados nas análises foram obtidos por meio de maceração de amostras de tecido foliar em nitrogênio líquido em almofariz, até a obtenção de um pó fino. O tecido macerado obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), na proporção de 1,0 mL de tampão para 0,2 g de tecido macerado. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade da enzima PAL foi determinada de acordo com metodologia proposta por Zucker (1965). Para isso, foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a uma mistura contendo 140 µL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,8) e 50 µL de L-fenilalanina 50 mM. A mistura da reação foi incubada a 37 °C durante 20 minutos. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 280 nm e o coeficiente de extinção molar de 10.000 mM⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade da PAL, a qual foi expressa em µM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da POX foi realizada de acordo com a metodologia de Kar & Mishra (1976) que se dá por meio da oxidação do guaiacol. Para esta reação, foram adicionados 20 µL do extrato enzimático à mistura de 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 40 µL de guaiacol 50 mM e 40 µL de peróxido de hidrogênio 125 mM. Após a incubação a 30 °C por 10 minutos, a absorbância foi medida a 480 nm em espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade da POX (CHANCE & MAEHLEY, 1955), a qual foi expressa em mM de tetraguaiacol produzido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme Giannopolitis & Ries (1977). A reação foi composta por 10 µL do extrato enzimático, 31 µL de água, 2 µL de riboflavina 0,2 mM, 2 µL de EDTA 10 µM, metionina 70 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8 e 15 µL de NBT 1 mM. As placas foram incubadas, por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30W. Em seguida, a leitura foi realizada a 560 nm e a unidade da enzima correspondeu à sua capacidade de inibir em 50% a fotorredução do NBT.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano & Asada (1981). Foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a uma solução contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 µL de ácido ascórbico 10 mM, 10 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70 µL de água. A atividade enzimática foi mensurada pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 3 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹, foi utilizado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em mM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A proteína total foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em microplacas de 96 cavidades.

Dos resultados obtidos, foram plotados gráficos cujos os valores positivos representam a ocorrência de atividade enzimática das enzimas analisadas e os negativos, a ausência dessa atividade.

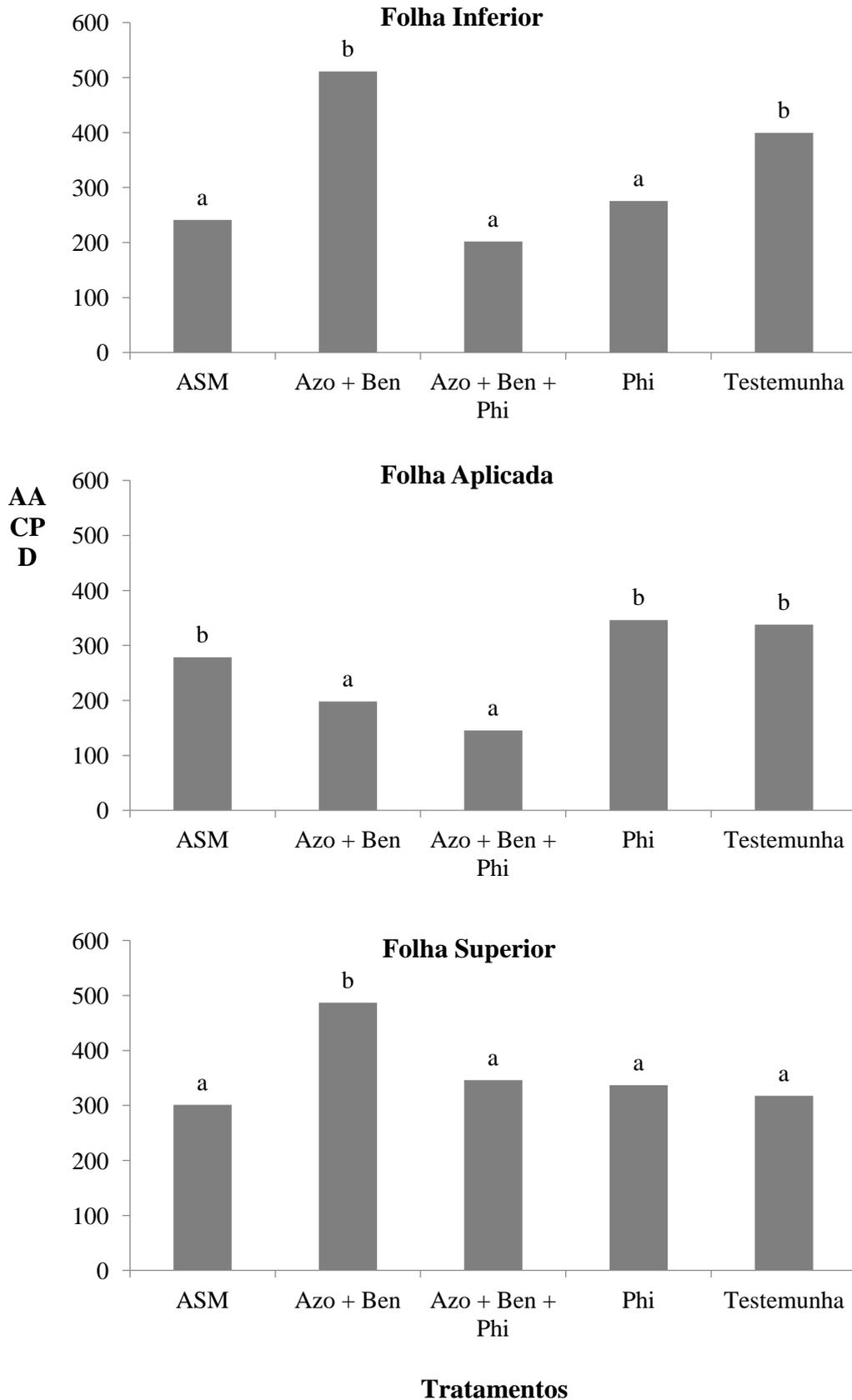
3 RESULTADOS

3.1 Proteção de plantas de soja contra oídio

Na avaliação da severidade do oídio em plantas de soja, observou-se que nas folhas inferiores houve diferença estatística entre os tratamentos. Acibenzolar-S-metil, Fosfito de Potássio e Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio, os quais apresentaram as menores AACPD quando comparadas a testemunha e porcentagens de controle de 57%, 30,97% e 49,41% respectivamente. Nas folhas aplicadas, os tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir e Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio diferiram estatisticamente dos demais e proporcionaram porcentagens de controle de 41,40% e 56,95%

respectivamente. Nas folhas superiores não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 3).

Figura 3 - Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade do oídio (AACPD) nas folhas inferior, aplicada e superior, em condições de casa-de-vegetação. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio). Barras seguidas com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).



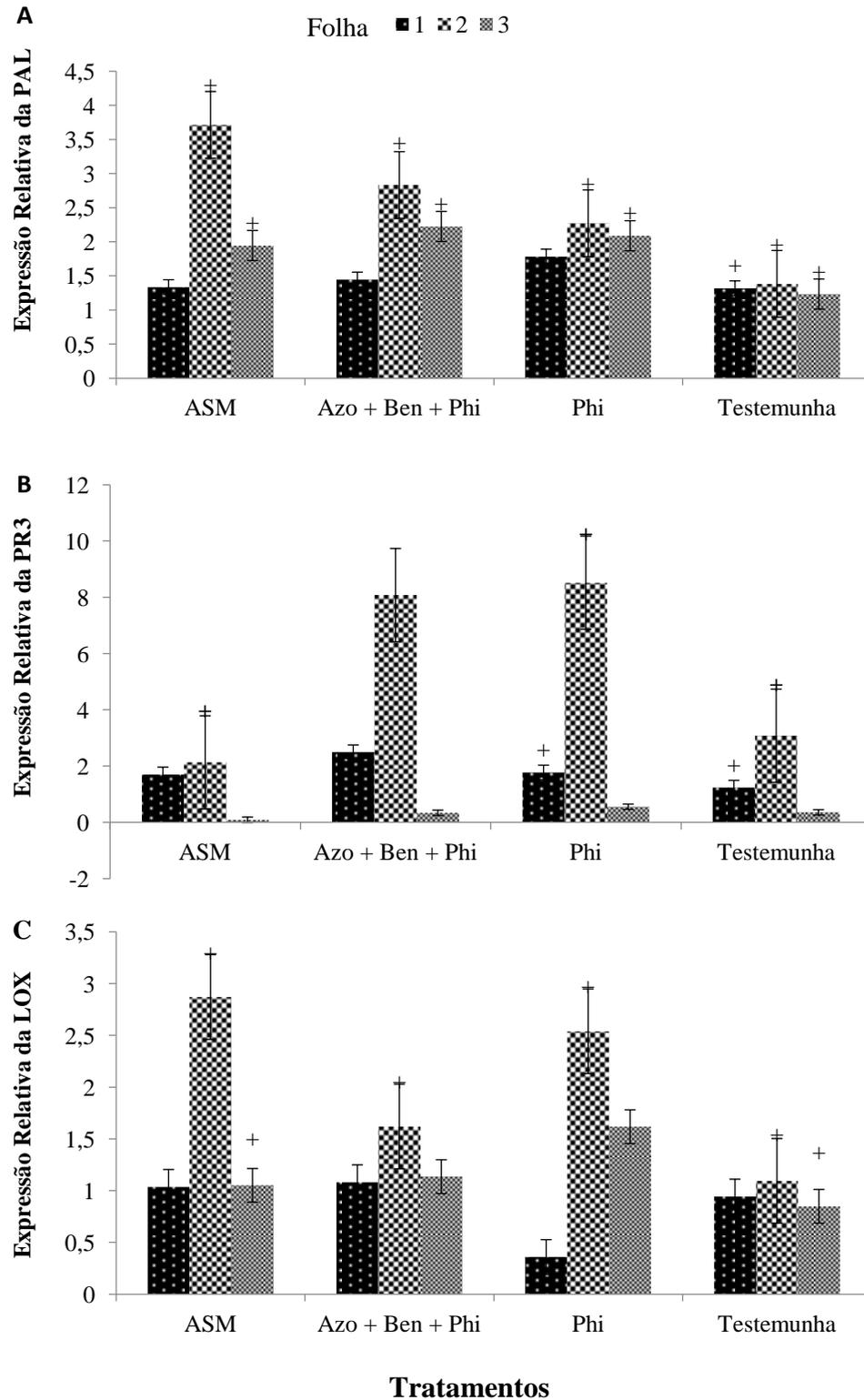
3.2 Análise da expressão dos genes *PAL*, *PR3* e *LOX*

Na análise molecular, em que se avaliou a expressão relativa de genes relacionados à defesa da planta às 24 horas após a aplicação dos tratamentos, para o gene *PAL*, observou-se que nas folhas inferiores somente o tratamento Fosfito de Potássio proporcionou o aumento dos transcritos desse gene em relação à testemunha. Nas folhas aplicadas e nas folhas superiores, todos os tratamentos aumentaram os níveis de transcritos em relação à planta controle. Porém o tratamento Acibenzolar-S-metil apresentou o maior nível de transcritos para as folhas aplicadas (Figura 4A).

Com relação aos níveis de transcritos do gene *PR3*, nas folhas inferiores houve aumento dos transcritos somente para o tratamento Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio. Nas folhas aplicadas, os tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio promoveram aumento dos transcritos quando comparados à testemunha. Nas folhas superiores, ocorreu baixo nível de transcritos para este gene, e todos foram próximos à testemunha (Figura 4B).

Para os níveis de transcritos do gene *LOX*, não ocorreu aumento de transcritos nas folhas inferiores. Nas folhas aplicadas, todos os tratamentos proporcionaram aumento dos transcritos. Nas folhas superiores, o aumento de transcritos ocorreu somente para o tratamento Fosfito de Potássio, de forma que o primeiro apresentou os maiores níveis (Figura 4C).

Figura 4 - Expressão relativa dos genes *PAL* (A), *PR3* (B) e *LOX* (C) nas folhas inferior (1), aplicada (2) e superior (3) de plantas de soja às 24 horas após a aplicação dos tratamentos. O símbolo (+) nas barras significa que ocorreu aumento dos transcritos do gene em relação à folha controle. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)



3.3 Atividade das enzimas PAL, POX, SOD e APX

Na avaliação da atividade relativa da enzima PAL em plantas de soja, nota-se que houve atividade nas folhas inferiores em todos os tempos avaliados e praticamente em todos os tratamentos. No tempo 24 horas a enzima apresentou aumento da atividade para todos os tratamentos, destacando Acibenzolar-S-metil como o maior pico. Às 72 horas, Acibenzolar-S-metil seguiu proporcionando a maior atividade da PAL comparada aos demais tratamentos. A partir de 96 horas, nota-se que o tratamento Acibenzolar-S-metil começa a apresentar uma queda de atividade enzimática. Nas folhas aplicadas, ocorreu atividade enzimática somente no tempo de 72 horas e o tratamento Fosfito de Potássio se destacou, sendo superior até mesmo ao indutor padrão Acibenzolar-S-metil. Nas folhas superiores, somente o tratamento Fosfito de Potássio apresentou um pequeno aumento da atividade da PAL (Figura 5).

Na análise da atividade relativa da enzima POX, observou-se nas folhas inferiores que o tratamento Fosfito de Potássio proporcionou pequeno incremento na atividade da POX às 24 e 48 horas. Picos consideráveis ocorreram às 96 horas para os tratamentos Acibenzolar-S-metil, Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio. Nas folhas aplicadas, os maiores picos de atividade ocorreram nos tempos 24, 72 e 144 horas. Às 24 horas, os tratamentos Acibenzolar-S-metil, Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio proporcionaram níveis elevados de atividade enzimática. Às 72 horas, os tratamentos Acibenzolar-S-metil e Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio mantiveram os picos de atividade quando comparados ao tempo anterior. Às 96 horas, somente as plantas pulverizadas com Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio apresentaram atividade superior, porém houve uma queda quando comparada ao tempo anterior. Às 144 horas, todos os tratamentos voltaram a apresentar atividade, destacando Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio com o maior pico, sendo superior ao indutor padrão Acibenzolar-S-metil. Nas folhas superiores, plantas pulverizadas com Fosfito de Potássio apresentaram uma pequena atividade nos tempos 24, 72 e 96 horas. Para o tratamento Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio, o maior pico de atividade da enzima ocorreu às 24 horas, porém não foi superior ao indutor padrão Acibenzolar-S-metil (Figura 6).

Figura 5 - Atividade relativa da enzima PAL em folhas inferior, aplicada e superior de plantas de soja. Os valores da atividade enzimática de cada tratamento foram normalizados com o valor da testemunha sem aplicação em cada tempo de coleta. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)

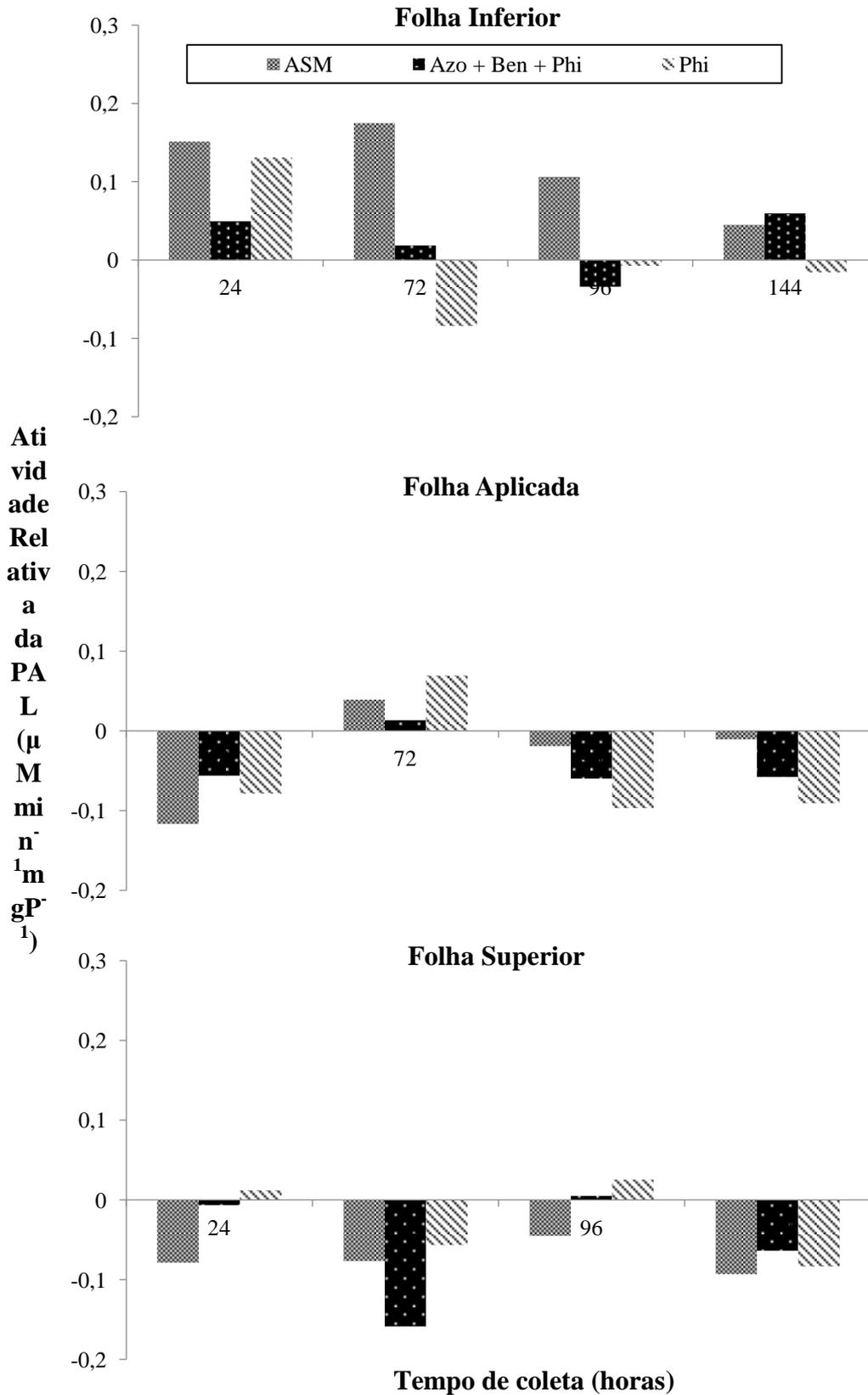
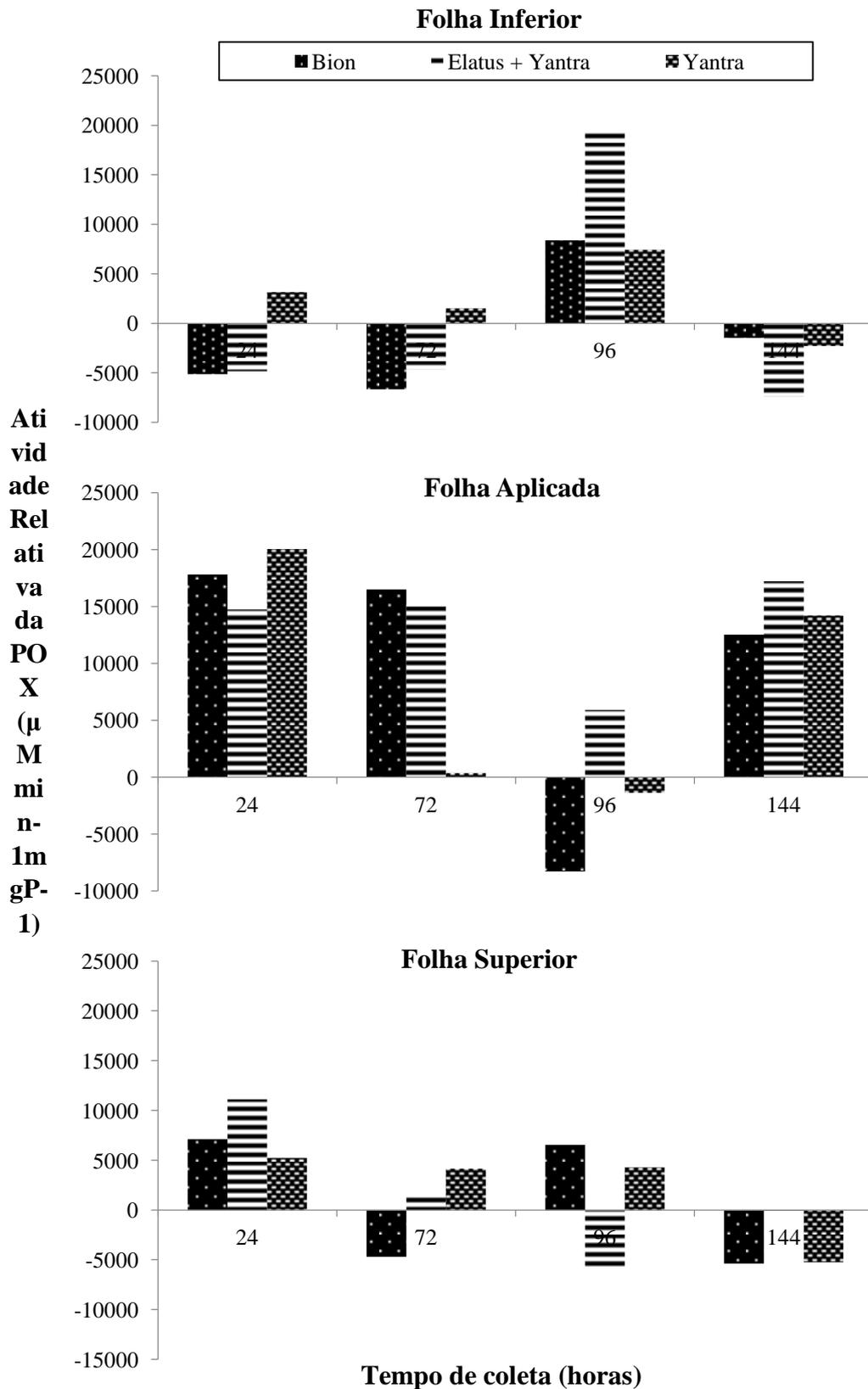


Figura 6 - Atividade relativa da enzima POX em folhas inferior, aplicada e superior de plantas de soja. Os valores da atividade enzimática de cada tratamento foram normalizados com o valor da testemunha sem aplicação em cada tempo de coleta. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)



Ao analisar a atividade da SOD, nota-se que os maiores picos de atividade ocorreram nos tempos 96 e 144 horas. Para as folhas inferiores, foi constatada atividade enzimática somente às 144 horas para plantas pulverizadas com os tratamentos Acibenzolar-S-metil, Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio. O mesmo ocorreu para as folhas aplicadas. Nas folhas superiores, não ocorreu pico de atividade de nenhum tratamento avaliado (Figura 7).

Para a atividade da APX, observou-se que as folhas inferiores apresentaram atividade em todos os tempos de coleta para os diferentes tratamentos. Às 24 horas, o tratamento Fosfito de Potássio apresentou o maior pico, sendo superior até mesmo ao indutor padrão Acibenzolar-S-metil. Às 96 horas, Acibenzolar-S-metil mantém o pico elevado de atividade e que praticamente se mantém às 144 horas. Nas folhas aplicadas, houve atividade para todos os tratamentos às 24 horas, destacando Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio com os maiores picos. Às 72 horas, plantas pulverizadas com Acibenzolar-S-metil apresentaram maior atividade, seguida por Fosfito de Potássio. Nas folhas superiores, os maiores picos de atividade ocorreram às 24 horas para os tratamentos Acibenzolar-S-metil e Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio (Figura 8).

Figura 7 - Atividade relativa da enzima SOD em folhas inferior, aplicada e superior de plantas de soja. Os valores da atividade enzimática de cada tratamento foram normalizados com o valor da testemunha sem aplicação em cada tempo de coleta. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)

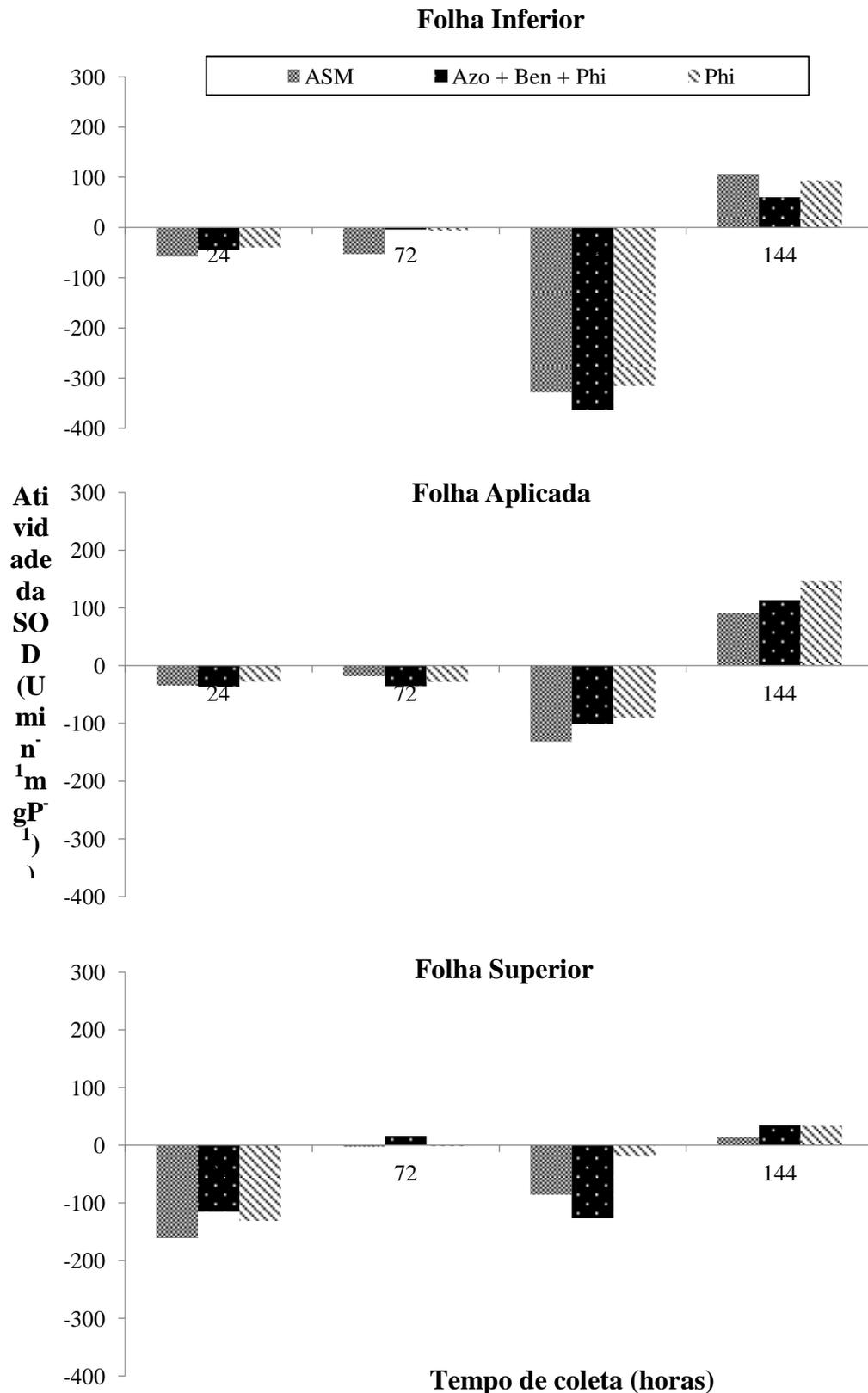
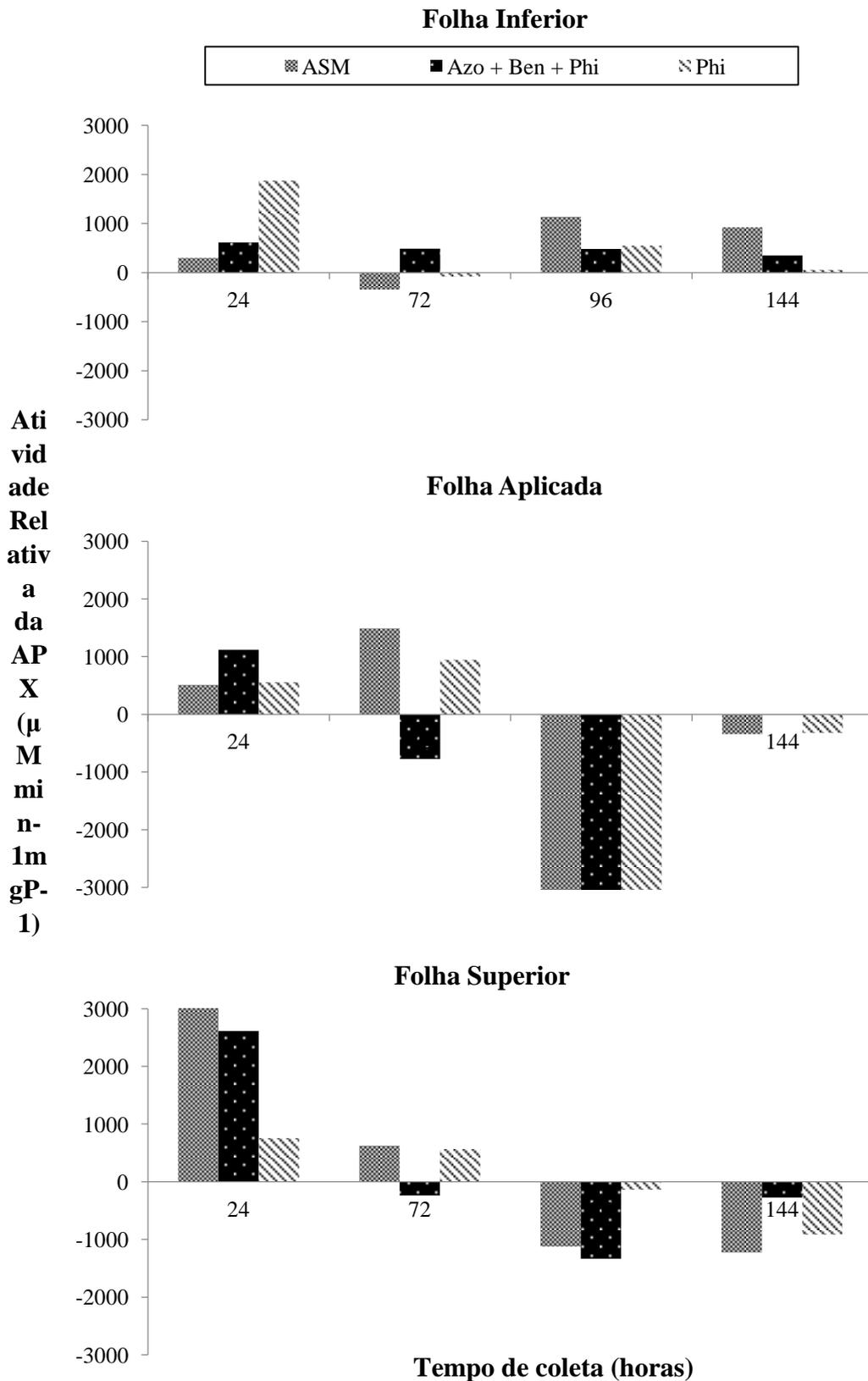


Figura 8 - Atividade relativa da enzima APX em folhas inferior, aplicada e superior de plantas de soja. Os valores da atividade enzimática de cada tratamento foram normalizados com o valor da testemunha sem aplicação em cada tempo de coleta. ASM (Acibenzolar-S-metil) Azo (Azoxistrobina); Ben (Benzovindiflupir); Phi (Fosfito de Potássio)



4 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o fosfito de potássio aplicado de forma isolada ou na presença de fungicida poderia potencializar a resistência da soja por meio da estimulação de respostas de defesa bioquímicas.

Os fosfitos são amplamente utilizados no controle de diversos patógenos. Seus íons, quando liberados dentro da planta, translocam tanto via xilema, quanto via floema e seu modo de ação pode ser de forma direta sobre o patógeno ou na ativação de respostas de defesa (DALIO et al., 2012). O primeiro passo foi verificar se o fosfito aplicado isolado ou associado, em somente um trifólio, foi capaz de translocar e controlar o oídio em diferentes pontos das plantas onde não ocorreu aplicação direta dos produtos. Quando se avaliou a severidade do oídio nas folhas aplicadas com fosfito isolado, não houve diferença em relação testemunha, podendo concluir que neste caso o fosfito não apresentou ação direta no controle do oídio nesta folha. Estes dados contradizem vários trabalhos que comprovam a sua ação direta em diversos patógenos, como *Phytophthora*, *Alternaria*, *Peronospora*, *Colletotrichum*, dentre outros (SILVA et al., 2011; BORZA et al, 2013; COSTA et al., 2017;).

Nos trifólios inferiores, Fosfito de Potássio quando aplicado isolado promoveu uma porcentagem de controle de 30,97%, não diferindo estatisticamente do indutor de resistência padrão Acibenzolar-S-metil. Essa porcentagem aumentou quando Fosfito de Potássio foi aplicado em associação com o fungicida Azoxistrobina + Benzovindiflupir, promovendo 49,41% de controle. Outros trabalhos comprovam essa ação de controle em partes da planta onde não ocorreu a aplicação direta de fosfito, como por exemplo, em batata. Borza et al. (2016) apresentaram resultados satisfatórios de controle em tubérculos quando a aplicação de fosfito foi realizada via foliar, devido à translocação descendente e ao acúmulo destes compostos. Em outro trabalho, Lobato et al. (2011) demonstraram diminuição da suscetibilidade de tubérculos aos patógenos *Phytophthora*, *Fusarium* e *Erwinia*, sugerindo a indução de respostas de defesa via foliar pela aplicação de fosfito.

Alguns autores relatam que o fosfito é capaz de induzir mecanismos de defesa por meio de mecanismos “*priming*”. Essas respostas incluem a explosão oxidativa, provocando um rápido acúmulo de EAOs, a deposição de componentes de reforço da parede celular como lignina e o aumento da transcrição de genes de defesa, dentre eles as PRs (ESHLAGHI et al., 2011; MACHINANDIARENA et al., 2012; MASSOUD et al., 2012). No presente trabalho o efeito “*priming*” não pode ser verificado, pois as plantas já apresentavam, mesmo que em baixa incidência, sinais da doença antes da aplicação dos tratamentos.

A formação de EAOs é o primeiro evento no reconhecimento planta-patógeno e estas contribuem para o reforço da resistência nos tecidos vegetais. No entanto, quando acumuladas, podem causar intoxicação e levar à perda da integridade da membrana do órgão da planta. Por outro lado, as plantas desenvolveram um complexo sistema de antioxidantes capazes de executar uma “limpeza oxidativa” e proteger as células de possíveis danos. Dentro deste sistema, podemos citar as enzimas peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), analisadas no presente trabalho (HOSSAIN E UDDIN, 2011).

O ânion superóxido é o primeiro das EAOs a ser formado pela célula. A SOD é uma enzima chave que funciona como a primeira linha de defesa antioxidante, pois converte radicais superóxido altamente reativos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. As enzimas APX e POX atuam, posteriormente, detoxificando o peróxido de hidrogênio (APEL E HIRT 2004; MITTLER et al. 2004; LOCATO et al., 2010). Monteiro et al. (2016) verificaram em mudas de cafeeiro tratadas com fosfito de manganês, a atividade da enzima APX 48 horas após detectar os picos de atividade da SOD. Porém, tal fato não pôde ser comprovado no presente trabalho, pois a enzima SOD apresentou picos de atividade somente às 144 horas para as folhas inferiores e aplicadas. Provavelmente, os tempos de avaliações da SOD não foram coincidentes com os picos de atividade da mesma e por esse motivo não foram detectados. Já as enzimas APX e POX apresentaram um perfil de atividade bem semelhante, onde obtiveram picos já às 24 horas nos tratamentos contendo fosfito para POX e para APX.

Em relação ao aumento dos transcritos da fenilalanina amônialiase (PAL), todos os tratamentos seguiram o padrão do indutor Acibenzolar-S-metil, destacando Fosfito de Potássio na folha inferior. As maiores atividades desta enzima ocorreram nas folhas inferiores nos tempos 24 horas para os tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio e às 144 para Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio. A PAL catalisa o primeiro passo no metabolismo dos fenilpropanóides, convertendo fenilalanina em ácido transcinâmico, para a biossíntese de compostos fenólicos e lignina, que atuam no reforço das paredes celulares contra a invasão por fitopatógenos (RAES et al., 2003; KUTCHAN et al., 2015). A atividade desta enzima pode sofrer mudanças rápidas sobre a influência de vários fatores, como o ataque de patógenos e o tratamento com indutores de resistência. Desta forma, pode-se dizer que a PAL serve como um marcador para a indução de resistência em plantas a doenças (MANDAL; MALLICK; MITRA, 2009). O aumento da atividade desta enzima por meio da aplicação de Fosfito de Potássio foi demonstrado por Ramezani et al. (2017), em plantas de pepino, e por Costa et al. (2017), em plantas de feijão.

A síntese do ácido salicílico induz ou potencializa muitas respostas de defesa e regula a produção de várias PR proteínas (PRPs). A transcrição dos genes das PRPs pode ocorrer dentro de minutos a horas após o ataque por patógenos. Existem já identificadas dezessete PRPs exercendo as mais diversas funções (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2015). O gene *PR3* esta ligada a síntese de quitinase, importante enzima com função de degradar a parede de fungos que possuem em sua composição a quitina. Além disso, estas enzimas podem atuar na liberação de oligossacarídeos encontrados na parede celular de plantas que são eliciadores para ativar as respostas de defesa (WU; BRADFORD, 2003). Neste trabalho, os tratamentos Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Fosfito de Potássio promoveram o aumento dos transcritos nas folhas inferiores.

Por outro lado, a lipoxigenase, codificada pelo gene *LOX*, representa uma enzima chave na rota do ácido jasmônico, responsável pela principal via de sinalização durante as repostas de defesa contra insetos e patógenos necrotróficos (OHLROGGE et al, 2015). No presente trabalho, observou-se que todos os tratamentos promoveram o aumento dos transcritos de *LOX* em todas as folhas aplicadas. Nas folhas superiores, somente Fosfito de Potássio apresentaram aumento dos transcritos. Segundo Fagundes-Nacarath et al. (2018), a aplicação de fosfito de cobre em plantas de feijoeiro promoveu o aumento da atividade desta enzima nos primeiros momentos da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum*, fato este que possa ter contribuído para a resistência da planta ao mofo branco. Apesar do oídio, que foi avaliado neste trabalho ser um fungo biotrófico, a resistência induzida atua contra um amplo espectro de patógenos, e o fosfito apresenta um grande potencial no controle de diversas doenças em soja.

A utilização de produtos que induzem resposta de defesa vem ganhando relevância no controle de doenças. Todavia, são poucos os trabalhos que relatam a sistemicidade dos mesmos na planta. Os resultados obtidos neste trabalho mostrou que todos os produtos utilizados foram capazes de ativar as respostas de defesa sistêmica em soja. Porém, somente os tratamentos contendo fosfito foram capazes de reduzir a severidade do oídio nas folhas inferiores e que a associação com o fungicida proporcionou a maior porcentagem de controle. Este fato é extremamente importante, pois durante a aplicação de fungicidas no campo, a porcentagem de produto que chega ao baixeiro das plantas não ultrapassa os 7% (CUNHA et al., 2008) o que dificulta o controle de diversas doenças nesta região. Os dados obtidos neste trabalho são promissores e a associação entre fungicida e fosfito deverá ser melhor investigada pois se mostra uma ferramenta adicional para o controle de diversas doenças.

5 CONCLUSÕES

1. A associação entre fosfito e fungicida reduz a infecção por oídio em folhas inferiores;
2. Os tratamentos Fosfito de Potássio, Azoxistrobina + Benzovindiflupir + Fosfito de Potássio e Acibenzolar-S-metil, em algum momento dos tempos analisados, ativaram as respostas de defesa bioquímica em plantas de soja;
3. Pôde-se constatar indução de resistência sistêmica para todos os tratamentos analisados;

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiar esse estudo, Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e Laboratório Genética Molecular (INOVA-Café) da UFLA pelo suporte na execução dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reative oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biotechnology**, v.55, p.373-399, 2004.

BORZA, T. Ion chromatography analysis of phosphite uptake and tranlocation by potato plants: Dose-dependent uptake and inhibition of *Phytophthora infestans* development. **Crop Protection**, v. 56, p. 74-81, 2014.

BORZA, T. et al. Phosphite uptake and distribution in potato tubers following foliar and postharvest applications of phosphite-based fungicides for late blight control. **Annals of Applied Biology**, p.1-13, 2016.

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**, v. 72 p. 248–254, 1976.

CARMONA, M.; SAUTUA, F. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. **Revista Plantio Direto**, v.126, p.19–22, 2011.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 764-775, 1955.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento - <file:///C:/Users/-098yr4w/Downloads/BoletimZGraosZagostoZ2018.pdf> - Acesso em 10/08/2018.

COSTA, B.H.G. et al. Potassium phosphite in the protection of common beans plants against anthracnose and biochemical defense responses. **Journal of Phytopathology**, p.1-8, 2017.

CUNHA, J.P.A.R. da et al. Efeito de pontas de pulverização no controle químico da ferrugem da soja. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.283-291, 2008.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DEL LONGO, O.T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant & Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

ESHRAHGI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v. 60, p. 1086-1095, 2011.

FAGUNDES-NACARATH, I.R.F. et al. Biochemical responses of common bean to white mold potentiated by phosphites. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.132, p.308–319, 2018.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. FRAC code list Sorted by mode of action. Disponível em: http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=fab94a9a_2 >. Acesso em: 22 nov. 2018.

GAO, S. et al. Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant Soil Environ.*, v.54, n.3, p.117-122, 2008.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GÓMEZ-MERINO, F.C.; TREJO-TÉLLZ, L.I. Biostimulant activity os phsphite in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 82-90, 2015.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). Micronutrients in Agriculture. **Soil Science Society of America**, Madison, p.329–370, 1991.

HAMMOND-KOSACH, K.E.; JONES, J.D.G. **Responses to Plant Pathogens**. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants, 2^oed, p. 984-1050, 2015.

HENNING, Ademir Assis et al. **Manual de identificação de doenças de soja:** Documentos 256. 5. ed. Londrina, 2014. 78 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105942-/1/Doc256-OL.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2018.

HOSSAIN, M.A.; UDDIN, S.N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.9, p.1094-1101, 2011.

JUHÁSZ, A.C.P. et al. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.34, n.276, p.66-75, set/out. 2013.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315–319, 1976.

KUTCHAN et al. **Natural Products** In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L.. Biochemistry and molecular biology of plants, 2^oed, p. 1132-1205, 2015.

LOBATO, M. C. et al. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 155-163, 2011.

LOCATO, V. et al. **Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.45-64.

MACHINANDIARENA, M. F. et al. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology, Stuttgart**, v. 169, p. 1417-1424, Sept. 2012.

MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, p. 642-649, 2009.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 2012. 643 p.

McDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1505-1519, 2018.

MASSOUD, K. et al. Dissecting Phosphite-Induced Priming in Arabidopsis Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. **Plant Physiology**, v.159, p.286-298, May 2012.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v.9, n.10, p.490-498, 2004.

MONTEIRO, A. C. A. et al. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, v.164, p.1043-1053, 2016.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.

OHLROGGE, J. et al. **Lipids**. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants, 2^oed, p. 337-400, 2015.

OLIVEIRA, S.H.F.; SANTOS, J.M.F.; GUZZO, S.D. Efeito da chuva sobre a tenacidade e eficiência de fungicidas cúpricos associados ao óleo vegetal no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatol. bras.** v.27, v.6, 2002.

ONG, G.H.; AYA OMER, M.O.; GEETHA, S. Copper toxic stress on *Aloe barbadensis* and its antioxidant response. **Transaction on Science and Technology**, v.2, n.1, p.65-73, 2015.

PRADO, Evandro Pereira et al. Velocidade do ar em barra de pulverização na deposição da calda fungicida, severidade da ferrugem asiática e produtividade da soja. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 45–50, 2010.

PEREIRA, R.B.; CARVALHO, A.D.F. de; PINHEIRO, J.B. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013, 5p. (Embrapa Hortaliças, Comunicado Técnica 95).

PFÄFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v.29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C. Quantificação de doenças foliares da soja por escalas diagramáticas. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, p.1-9, 2010.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; REIS, A. C. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. Florianópolis: Insular, 2007. 176 p.

RANEZANI, M.; RAHAMANI, F.; DEHESTANI, A. The effect of potassium phosphite on PR genes expression. And the phenylpropanoid pathways in cucumber (*Cucumis sativus*) plants inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p.366-372, 2017.

SAUTTER, C.K. et al. Síntese de trans-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1097–1103, 2008.

SCHROETTER, S.; ET AL. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). **Landbauforschung Volkenrodxe**, v. 56, p. 87-99, 2006.

SILVA JUNIOR, G. J.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; GOES, A. **Pinta preta: a doença e seu manejo**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2016. 208p.

SILVA, O.C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, v.30, p.598-604, 2011.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E.M. Controle do inóculo inicial para redução dos danos pela podridão-‘olho-de-boi’ em macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.4, p.1044-1054, 2010.

WALTERS, D.R.; FOUNTAINE, J.M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, p. 523-535, 2009.

WANG, S. et al. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea*. **Botanical Bulletin – Academia Sinica Taipei**, v.45, p.203-212, 2004.

WU, C.T.; BRADFORD, K.J. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiol.** v.133, p.263-273, 2003.

YRUELA I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145–146, 2005.

YUREKLI, F.; PORGALI, Z. B. The effect of excessive exposure to copper in bean plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.48, n.2, p.7-13. 2006.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine de aminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 40, p. 779-784, 1965.