



CLÁUDIA MARIA DE OLIVEIRA VEIGA

**APLICAÇÕES FOLIARES DE TETRAAMINOETANOL DE
COBRE NO MANEJO DA ANTRACNOSE EM SOJA**

**LAVRAS – MG
2022**



CLÁUDIA MARIA DE OLIVEIRA VEIGA

**APLICAÇÕES FOLIARES DE TETRAAMINOETANOL DE COBRE NO MANEJO
DA ANTRACNOSE EM SOJA**

Dissertação 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 Mestre.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Veiga, Cláudia Maria de Oliveira.

Aplicações foliares de tetraaminoetanol de cobre no manejo da
antracnose em soja / Cláudia Maria de Oliveira Veiga. - 2022.

56 p. : il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. *Glycine max.* 2. *Colletotrichum truncatum.* 3. Controle
químico. 4. Mecanismos de defesa. I. Resende, Mário Lúcio Vilela
de. II. Título.

CLÁUDIA MARIA DE OLIVEIRA VEIGA

**APLICAÇÕES FOLIARES DE TETRAAMINOETANOL DE COBRE NO MANEJO
DA ANTRACNOSE EM SOJA**

**FOLIAR APPLICATIONS OF COPPER TETRAAMINOETHANOL IN THE
MANAGEMENT OF ANTHRACNOSIS IN SOYBEAN**

Dissertação 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 Mestre.

Aprovada em 04 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA
Dra. Lorena de Oliveira Moura - UFLA
Dra. Deila Magna dos Santos Botelho - UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Aos meus pais, Geraldo e Efigênia

Aos meus irmãos Clayton, Christiano e Claudiney

Aos meus sobrinhos Caetano, Helena e Francisco

Com todo meu amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e força para vencer mais essa importante etapa da minha vida. Sem Ele não seria possível chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, gratidão por ter sido mais que uma escola durante todos esses anos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende pela orientação, amizade, paciência e por todos os conhecimentos compartilhados, carrego a certeza de que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pela disponibilidade e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, por todo apoio e pelas valorosas contribuições na montagem e condução dos experimentos.

As meninas da República FitoNelas, pelos momentos e sorrisos compartilhados.

Aos meus pais, Geraldo e Efigênia, por não medirem esforços na minha educação e por sonharem junto comigo, minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo, amor e afeto, vocês são incríveis.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram na conclusão deste trabalho e aos que mesmo de longe ofertaram a mim apoio, incentivo e amor, o meu muito obrigada.

Dedico essa conquista a vocês !

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente a família Fabaceae, é a principal cultura de grãos produzida no Brasil. Dentre os fatores que limitam o rendimento da soja destaca-se a ocorrência de doenças, como a antracnose, cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum truncatum*. Essa doença causa perdas econômicas significativas em lavouras, podendo se manifestar desde o plantio até o final do ciclo da cultura. Dentre as medidas de controle mais utilizadas, o controle químico se destaca em sua eficiência no manejo de doenças da soja, sendo o uso de fungicidas cúpricos uma alternativa de estratégia anti-resistência. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tetraaminoetanol de cobre no manejo da antracnose em soja e nos mecanismos de defesa da planta ao patógeno. O tetraaminoetanol de cobre foi avaliado nas doses de 1,25, 2,0 e 3,0 mL L⁻¹ aplicadas isoladamente e em associação com o fungicida fluxapiroxade + piraclostrobina nas plantas em estágio V7. Os experimentos foram conduzidos em condições *in vitro* e casa de vegetação. No experimento *in vitro* foi avaliada a eficiência do tetraaminoetanol na redução do crescimento micelial de *C. truncatum*, na produção de esporos e na viabilidade dos mesmos. No experimento em casa de vegetação, plantas de soja foram inoculadas com o fungo *C. truncatum* 3 dias após a aplicação do cobre. A severidade da doença nas folhas foi avaliada semanalmente após o aparecimento dos primeiros sintomas. Para a quantificação da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) e dos teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel foram realizadas coletas de folhas às 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação do produto e às 24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno. O delineamento utilizado no experimento *in vitro* foi inteiramente casualizado com 6 repetições e em casa de vegetação, blocos casualizados com 4 repetições. Tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 mL e 3 mL L⁻¹ inibiram a esporulação do *C. truncatum* em placas de Petri, porém não inibiram o crescimento micelial. Os mesmos tratamentos controlaram a severidade da antracnose em casa de vegetação e aumentaram a atividade das enzimas PAL e PPO e a produção de lignina solúvel nas plantas. Sugere-se que o tetraaminoetanol de cobre agiu de forma protetiva nas folhas, inibindo a esporulação e colonização, e contribuiu para a ativação de mecanismos de defesa constitutiva.

Palavras-chave: *Glycine max*. *Colletotrichum truncatum*. Controle químico. Mecanismos de defesa.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), belonging to the Fabaceae family, is the main grain crop produced in Brazil. Among the factors that limit soybean yields is the occurrence of diseases, such as anthracnose, whose etiological agent is the fungus *Colletotrichum truncatum*. This disease causes significant losses in crops and can occur from planting until the end of the crop cycle. Among the most used control measures, chemical control stands out in its efficiency in the management of soybean diseases, and the use of copper fungicides is an alternative anti-resistance strategy. The objective of this work was to evaluate the effect of copper tetraaminoethanol in the management of anthracnose in soybeans and in the defense mechanisms of the plant against the pathogen. The product was evaluated at different doses with isolated applications and in association with the fungicide fluxapyroxad + pyraclostrobin in plants at the V7 stage. The experiments were conducted under *in vitro* and greenhouse conditions. The *in vitro* experiment evaluated the efficacy of tetraaminoethanol tested at different doses in reducing *C. truncatum* mycelial growth, spore production and spore viability. For the experiment conducted in the greenhouse, copper was applied and 3 days after the application, the pathogen inoculation was performed. The severity of the disease on the plants was evaluated weekly after the occurrence of the first symptoms. After the application of the products, leaves were collected at different times (after application of the product and after inoculation of the pathogen) to quantify the activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) and the levels of total soluble phenolic compounds and soluble lignin. The design used in the *in vitro* was completely randomized with 6 replications and in a greenhouse, randomized blocks with 4 replications. Copper tetraaminoethanol in isolated doses inhibited *C. truncatum* sporulation in Petri dishes, but did not inhibit mycelial growth. The product in doses of 2 mL and 3 mL ha⁻¹ it controlled the severity of anthracnose in the greenhouse, increased the activity of PAL and PPO enzymes and the production of soluble lignin in the plants. It is suggested that the copper tetraaminoethanol acted in a protective manner on the leaves, inhibiting sporulation and colonization, and presented a systemic effect on plants, contributing to the activation of constitutive defense mechanisms.

Keywords: *Glycine max*. *Colletotrichum truncatum*. Chemical control. Defense mechanisms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 A cultura da soja	12
2.2 Manejo de doenças na soja	13
2.3 Antracnose	14
2.4 Resistência de fungos a fungicidas	15
2.5 Fontes de cobre	18
2.6 Mecanismos de defesa de plantas a patógenos	19
3. HIPÓTESE.....	21
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivos específicos	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Experimento <i>in vitro</i>	21
5.2 Experimento em casa de vegetação	23
5.2.1 Inoculação de <i>Colletotrichum truncatum</i>	23
5.2.2 Aplicação dos tratamentos	24
5.2.3 Avaliação de severidade da doença.....	24
5.3 Análises bioquímicas	25
5.3.1 Fenilalanina amônia-liase (PAL)	25
5.3.2 Peroxidase (POX).....	25
5.3.3 Polifenol oxidase (PPO).....	26
5.3.4 Proteína total	26
5.3.5 Determinação de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel.....	26
5.4 Análise estatística	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), viabilidade dos esporos e germinação.....	27
6.3 Severidade da antracnose em casa de vegetação	31
6.4 Fenilalanina amônia-liase (PAL)	34
6.5 Peroxidase (POX)	35
6.6 Polifenol oxidase (PPO).....	37
6.7 Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel.....	39
7. CONCLUSÃO.....	43

REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	52

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta oleaginosa, com produção destinada a várias finalidades, incluindo fonte de alimentação animal e produção de biocombustíveis (DOMINGUES et al., 2014). Atualmente, é a principal cultura de grãos produzida no Brasil. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022) a estimativa da produção na safra 2021/22 é de 122,8 milhões de toneladas, queda de 14,4% em relação à safra anterior. Esses números podem ser explicados devido a fatores climáticos enfrentados na região Sul do país e que ocasionaram redução nos índices de produtividade. Dentre os estados brasileiros produtores de grãos, o Mato Grosso ocupa o primeiro lugar, sendo responsável por cerca de 31,3% da produção nacional (CONAB, 2022).

Apesar da alta produção da cultura, a busca crescente por maiores produtividades é constante. Dentre os fatores que mais limitam a produtividade estão as doenças de plantas, principalmente aquelas que acometem no final do ciclo da cultura, responsáveis por perdas significativas. Doenças como a ferrugem asiática, antracnose, mancha alva, requeima, podridão vermelha da raiz, mofo branco e oídio se destacam como as principais doenças da cultura (ITO, 2013).

Com o intuito de minimizar as perdas na produtividade é indicado o uso do manejo adequado do sistema para reduzir a resistência dos fungos aos fungicidas. O controle químico ainda é o método mais utilizado nas lavouras no controle de doenças em plantas devido a sua maior eficiência de aplicação em relação aos demais modos de controle. No entanto, o uso dessa prática sem estratégias de manejo adequado pode ocasionar a seleção de fungos resistentes, comprometendo a eficiência da molécula fungicida (GHINI; KIMATI, 2002), como também, causar impactos negativos ao meio ambiente.

Um dos impactos ocasionados pela resistência na cultura da soja é a baixa eficiência dos ingredientes ativos, dificultando as estratégias de manejo de doenças. Uma alternativa para contornar esse problema é o uso de uma mistura de fungicidas sistêmicos, como triazóis e estrobirulinas com fungicidas protetores, por exemplo, os cúpricos (GODOY, 2012; REIS et al., 2019; SIKORA et al., 2014). A fonte de cobre utilizada neste trabalho é a tetraaminoetanol de cobre, que ainda carece de estudos sobre a sua eficiência no controle de doenças, bem como os mecanismos bioquímicos de defesa das plantas ativados após o ataque de patógenos.

Como mecanismos de defesa, as plantas produzem compostos fenólicos como as ligninas, formadas a partir da rota dos fenilpropanoides. Nessa rota participam enzimas chave como a fenilalanina amônia-liase (PAL), primeira enzima da rota, que sintetiza o ácido *trans*-cinâmico a partir da *L*-fenilalanina derivada do metabolismo primário (ZHANG & LIU, 2015). A peroxidase (POX), por sua vez, é a última enzima da rota dos fenilpropanoides, responsável por polimerizar os monolignóis (FREI, 2013). Outra enzima de grande importância é a polifenol oxidase (PPO), que está relacionada à oxidação de compostos como ácido ascórbico e fenóis, e à lignificação (RAES et al., 2003).

A utilização de fungicidas protetores como estratégias anti-resistência está sendo cada vez mais relevante para os produtores e empresas. Diante desse fato e visando a importância de manter um manejo adequado, este trabalho avaliou o efeito de aplicações foliares de cobre (tetraaminoetanol de cobre) no controle da antracnose e na ativação dos mecanismos de defesa da planta após o ataque do patógeno em questão.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta oleaginosa (leguminosa) de origem asiática, pertencente à família Fabaceae. A cultura apresenta cultivares de porte determinado, indeterminado e semi-determinado. Forma vagens em seu estágio reprodutivo e apresenta grãos com tegumento marrom ou amarelo-palha, dependendo da cultivar (THOMAS et al., 2018).

A soja é considerada a principal cultura de grãos produzida no Brasil. Seu cultivo tem cerca de cinco mil anos, originário da China, podendo ser usado como fonte de alimento, tanto para humanos quanto animais (BORGES et al., 2017). A introdução da soja no Brasil ocorreu em 1882, no estado da Bahia (BORGES et al., 2017), e tem crescido progressivamente sua produção em área cultivada no país. A produção da soja é destinada a fabricação de farelo, ração animal e óleo para consumo humano, entre outros biocombustíveis (DOMINGUES et al., 2014).

A soja é considerada uma commodity sendo um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022) a estimativa da produção na safra 2021/22 é de 122,8 milhões de toneladas, queda de 14,4% que pode ser explicada devido a fatores climáticos enfrentados na região Sul do país e

que ocasionaram redução nos índices de produtividade. Os estados de Mato Grosso, Paraná e Goiás apresentam os maiores índices de produção em toneladas do grão (CONAB, 2022).

2.2 Manejo de doenças na soja

As doenças de plantas são responsáveis por perdas significativas na cultura da soja destacando-se a ferrugem asiática, antracnose, mancha-alvo, requeima, podridão vermelha da raiz, mofo branco e oídio (ARRUDA et al., 2012).

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakospora pachyrhizi*, é uma das principais doenças da soja. Essa doença tem sintomas evidentes nas folhas, caracterizados por lesões de coloração bronzeada ou pardo-avermelhadas com muita esporulação. As condições determinantes para o estabelecimento da doença são molhamento foliar e temperatura noturna entre 18 e 24 °C. A semeadura antecipada com cultivares precoces e resistentes ajudam a diminuir a pressão do inóculo e também favorecem o controle químico. Os fungicidas preventivos são consideradas estratégias eficazes no controle da doença (NAVARINI et al., 2007).

Os sintomas da mancha alvo (*Corynespora cassicola*) caracterizam-se por pequenos anéis concêntricos com halo amarelo nas folhas, que crescem até aproximadamente 2 cm e tem coloração parda em formato circular. Após o estabelecimento da doença, é possível observar desfolha prematura na lavoura, presente em cultivares susceptíveis, assim como o apodrecimento de vagens e hastes. O fungo também ataca as sementes (ALMEIDA et al., 2005; SNOW; BERGGREN, 1989). Atualmente, a mancha alvo tem causado grandes danos nas lavouras, principalmente na região Centro-Oeste, alertando os produtores para tal doença (RIBEIRO et al., 2016). Como controle para mancha alvo, recomenda-se o uso de cultivares resistentes, tratamento de sementes, rotação de culturas e a aplicação de fungicidas (ALMEIDA et al., 2005).

Rhizoctonia solani e *Fusarium solani* são patógenos de solo, causadores de doenças radiculares. Causam normalmente murchas e podridões e os sintomas iniciais aparecem nas raízes. No caso da *R. solani*, agente causal da requeima, os sintomas são caracterizados por manchas de coloração escura na haste (GODOY et al., 2016). Na podridão vermelha, causada por *F. solani*, os sintomas são a descoloração vascular acastanhada que se estende em direção ao caule e folhas cloróticas que se tornam necróticas (HARTMAN et al., 2015). Para o controle

tanto da requeima quanto da podridão vermelha é recomendado o manejo de todo o sistema associado a menores estandes e tratamento de sementes (BASSETO et al., 2007).

O mofo branco, doença cujo agente etiológico é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, produz uma estrutura de resistência denominada escleródio, capaz de dificultar seu controle em determinados cultivos. Essa estrutura garante a propagação do patógeno por diversas áreas. Condições de umidade e temperaturas amenas favorecem a infecção e o aparecimento de sintomas nas plantas, iniciando-se por necrose nas folhas (CHEN; WANG, 2005). O controle utilizado pode ser químico com fungicidas no tratamento de sementes e aplicação nos órgãos aéreos, visando a redução da intensidade da doença (TUPICH et al., 2017).

O oídio da soja (*Erysiphe diffusa*) ganhou importância econômica a partir da safra 1996/97, quando ocasionou perdas de até 40% (SARTORATO; YORINORI, 2001). O patógeno é considerado modelo de estudo para muitas pesquisas envolvendo doenças com outros fitopatógenos devido a sua rápida proliferação e fácil inoculação, muitas vezes resultando em colonização espontânea. As condições favoráveis para o aparecimento de oídio em soja são alta umidade relativa do ar, temperatura entre 18° e 20 °C e baixa precipitação, o ciclo dura entre sete a dez dias (PICCINI; FERNANDES, 2003).

O uso de cultivares resistentes é uma boa opção de controle da doença, porém não é a mais viável, visto que muitas delas não são recomendadas ou não estão disponíveis para determinadas regiões. A partir disso, o método mais eficiente é o controle químico aplicado de forma preventiva (TOIGO et al., 2008).

2.3 Antracnose

A antracnose, doença cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum truncatum*, é considerada atualmente uma das principais doenças da soja pois pode prejudicar todo o ciclo da cultura, desde as sementes até a planta adulta. As condições ideais para o estabelecimento da doença são temperaturas acima de 25 °C e alta umidade relativa, condições típicas do bioma Cerrado (DIAS et al., 2016).

Esse fungo foi descrito pela primeira vez por Andrus & Moore (1935) e pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales, família Glomerellaceae. Em sua caracterização morfológica o fungo apresenta conídios unicelulares, hialinos, septados e acérvulos pretos com setas como uma forma de estrutura de resistência (PUTZKE et al., 2002).

A doença causa a morte de plântulas, necrose em folhas e vagens, manchas nas hastes e perdas que podem chegar a 100% sob condições favoráveis ao patógeno (DIAS et al., 2019; HARTMAN et al., 2016; ROGÉRIO et al., 2016). A detecção do fungo antes do plantio é fundamental (MACHADO, 2000). Plântulas procedentes de sementes contaminadas apresentam necrose nos cotilédones que podem expandir para o hipocótilo, resultando no tombamento.

O tratamento de sementes e a pulverização com fungicidas são as principais medidas de controle da doença (MACHADO, 2000; PEREIRA et al., 2009). Outra opção para o controle da doença é mediante o uso da resistência genética. Nos Estados Unidos, a cultivar Mandarin 507 apresentou alta resistência à antracnose quando comparada com a cultivar Williams 82 (HARTMAN, 2015). No Brasil, estudo mostra níveis de resistência entre cultivares, porém sem imunidade à doença (COSTA et al., 2006).

Nataraj et al. (2020) identificaram genes de resistência em um banco de germoplasma de soja, onde 5 genótipos se apresentaram como altamente resistentes à antracnose. Esse estudo mostra a importância do investimento em programas de melhoramento e de se mapear os genes que governam a resistência.

Outras medidas de controle também podem ser utilizadas no manejo da antracnose em soja: manejo adequado do solo, rotação de culturas, aumento no espaçamento entre plantas e entre linhas (controle da população de plantas), uso de sementes idôneas (certificadas), boa adubação, medidas preventivas no geral. (BASSO et al., 2015; KIMATI et al., 1997).

2.4 Resistência de fungos a fungicidas

A resistência aos fungicidas pode ser definida quando um patógeno em sua população se torna resistente a um determinado grupo químico aplicado. A resistência pode nem sempre ser completa, podendo ter apenas uma sensibilidade reduzida (BRADLEY et al., 2020). Para que a resistência aos fungicidas se desenvolva, os isolados resistentes já devem estar na população. Em geral, mutações naturais são responsáveis por isolados resistentes (BRADLEY et al., 2020).

Por ser um método eficiente na maioria dos casos, o uso do controle químico nas lavouras ainda é a forma mais utilizada no controle de doenças em plantas. No entanto, o uso dessa prática sem estratégias de manejo adequado pode ocasionar a seleção de fungos

resistentes a fungicidas, comprometendo a eficiência do mesmo, e também causar impactos negativos ao meio ambiente. Questões como dose de produtos, quantidade e forma de aplicação, práticas agrícolas, características de solo e relevo da propriedade interferem nessa eficiência por ocasião o processo de resistência a fungicidas (SPADOTTO; BETTIOL, 1997).

Os motivos pelos quais as resistências ocorrem e seus diferentes tipos são: detoxificação, desvio do sítio bloqueado, não conversão do composto, redução de afinidade do sítio, aumento no fluxo de fungicida, entre outros (DELP et al., 1988; DEZEM et al., 2019). Para maior controle das moléculas e redução nos casos de resistência dos ativos criou-se o Comitê de Ação de Resistência a Fungicida (FRAC), responsável por classificar os diferentes grupos de fungicidas e gerenciar a resistência a fungicidas.

Para que se entenda os tipos de resistência, é imprescindível entender os mecanismos de ação dos fungicidas nas plantas. Os exemplos de resistência a fungicidas mais comuns são as estrobirulinas e os triazóis. As estrobirulinas bloqueiam diretamente a transferência de elétrons pelo complexo citocromico, através da inibição da óxido-redutase de ubihidroquinona-c citocromo c. Já no caso dos triazóis, vários mecanismos de resistência estão envolvidos, como por exemplo, alteração na síntese de ergosterol (GHINI & KIMATI, 2002).

Fungicidas inibidores de quinona oxidase (QoI, estrobilurinas) foram introduzidos no mercado em 1990 e a resistência de fungos a esta classe química foi documentada em 1998 (BRENT; HOLLOMON, 1998; PARREIRA et al., 2009). Desde então aproximadamente 60 espécies de fungos em mais de 20 culturas têm sido identificadas como resistentes aos fungicidas QoI, incluindo a cultura da soja (FRAC, 2013).

Prince et al. (2015) relataram a ocorrência de resistência em isolados de *Cercospora kikuchii* (mancha púrpura) a fungicidas QoI em Louisiana, EUA. O mesmo ocorre com isolados de *Cercospora sojina*, agente etiológico da mancha “olho-de-rã”. Em diversos trabalhos foi reportada a ocorrência de resistência dos patógenos a fungicidas QoI, em diversos locais nos Estados Unidos (STANDISH et al., 2015; ZHANG, 2012; ZANG et al., 2018; ZENG et al., 2015).

Xavier et al. (2013) avaliaram a sensibilidade do carbendazim e do prothioconazol em uma amostra de 24 isolados de *Corynespora cassiicola* na soja colhida de 1996 a 2011 nos estados do Paraná, Mato Grosso e São Paulo (Brasil) e Corpus Christi (Paraguai). Os valores da concentração efetiva de 50% (EC50) foram estimados pela redução relativa do crescimento de micélio no meio alterado por fungicida com as doses de 0, 0,5, 1, 10, 100 e 1000 µg de ingrediente ativo/mL. Para o carbendazim quatro isolados altamente resistentes

(EC₅₀>50µg/mL) foram observados em amostras coletadas no Mato Grosso em 2008, e no Paraná e Mato Grosso em 2011. Os valores de EC₅₀ para o protioconazol variaram de 0,47 µg/mL a 26,44 µg/mL (média de 5,02 µg/ml). Segundo os autores, tais resultados reforçam a ocorrência de resistência de *C. cassicola* ao fungicida benzimidazol nos estados do Paraná e Mato Grosso.

A sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas ditiocarbamato, cloronitrila, triazol, estrobilurina e carboxamida foram avaliadas por Juliatti et al. (2017). Os autores constataram redução na eficácia de triazóis, carboxamidas e ressaltaram a importância da utilização de fungicidas multissítios para o manejo da ferrugem da soja, visando maior eficácia.

Um dos impactos da resistência a fungicidas na cultura da soja é a baixa eficiência de ingredientes ativos atrelado a populações menos sensíveis de fungos que dificultam a utilização de estratégias de manejo de resistência como por exemplo, a rotação de mecanismos de ação e grupos químicos (BAIBAKOVA et al., 2019).

De acordo com Godoy (2012), Reis et al. (2019) e Sikora et al. (2014), uma estratégia para reduzir a ocorrência de resistência, é a aplicação de misturas de triazóis e estrobirulinas com fungicidas protetores. A importância da utilização de fungicidas protetores nas estratégias anti-resistência está levando as empresas a desenvolverem programas específicos para o controle de doenças, onde explicitamente recomendam ao produtor que se inclua um produto de contato no manejo. Essa medida ainda sofre uma barreira devido ao costume do produtor em usar produtos sistêmicos (AZEVEDO et al., 2003).

A perda de eficiência dos defensivos é de extrema importância, isso porque afeta toda a cadeia produtiva, e conseqüentemente ocasiona o aumento de preços nos produtos em toda a cadeia (AZEVEDO et al., 2007). Para se adotar estratégias anti-resistência, é importante a detecção do patógeno na população antes da sua instalação, pois depois da ocorrência do problema a única possibilidade de controle será com aplicação de outro mecanismo de ação ou outro método de controle (GHINI; KIMATI, 2002). O uso de outros tipos de controle como biológico, genético ou cultural, também diminuem o risco de resistência. A resistência de fungos a fungicidas é difícil de ser eliminada, mas pode ser reduzida com a associação de práticas de manejo apropriadas para determinado patossistema (JACKSON-ZIEMS et al., 2017)

2.5 Fontes de cobre

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para as plantas. Ele participa de vários processos importantes como a fotossíntese, respiração, metabolismos de nitrogênio e carbono (DALCORSO et al., 2014), e é um componente chave de alguns fungicidas protetores no controle de várias doenças. Além de participar de vários processos fisiológicos na planta, ele está envolvido em mecanismos de resistência a doenças contra fungos e bactérias, atuando como indutor de resistência. O cobre está envolvido diretamente na formação de compostos fenólicos (KUMAR et al., 2017).

Graham et al. (1991) relataram que muitos anos antes do cobre ser reconhecido como fator essencial para as plantas, já se observava que a aplicação de sais de Cu no controle de patógenos foliares era eficaz. A maioria das propriedades fungistáticas dessa fonte são aplicadas contra patógenos foliares porque quando aplicados diretamente no solo é rapidamente absorvido e apenas uma baixa concentração permanece na solução disponível.

Os mecanismos usados por esse elemento no controle de doenças em plantas estão relacionados a toxidez direta, síntese de lignina e ativação da enzima polifenol oxidase (GRAHAM et al., 1991). O cobre está envolvido na participação de muitas enzimas e ligado a síntese de proteínas, carboidratos e fixação biológica de nitrogênio (HUBER; GRAHAM, 1999). Além disso, é um regulador de vários sistemas enzimáticos envolvidos na defesa das plantas a infecção, na produção de compostos antimicrobianos e na resistência geral às doenças (GRAHAM, 1983; GRAHAM; WEBB, 1991).

O cobre é encontrado nos fungicidas na forma de cobre bivalente (Cu^{2+}) e quando reduzido a monovalente (Cu) tende obter absorção celular nas folhas, sendo transferido para o interior da célula mediante a proteína COPT6, responsável na redistribuição e remobilização do metal na planta. Essa absorção ocorre devido a ação da oxidase redutase férrica 4 (PRINTZ et al., 2016).

Para se determinar o desempenho de um fungicida cúprico deve-se analisar a concentração de cobre bioativo disponível para as plantas, e não pelo nível de cobre metálico. O cobre metálico, por sua vez, não é biologicamente ativo, mas funciona como reservatório para controle de doenças.

Os fungicidas cúpricos apesar de apresentarem baixo efeito residual, quando comparados com os sistêmicos, possuem baixo custo, amplo espectro e múltiplos sítios de ação (CHALFOUN, 1999), favorecendo sua aplicação e seu incremento no manejo do sistema. O

modo de ação do cobre nas plantas é diretamente ligado na germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo, agindo com uma formação de barreira tóxica (GARCIA, 1999).

Em soja, Bedin (2018) verificou que as aplicações foliares de cobre com caldas fitossanitárias afetam a reação da planta à ferrugem asiática pela variação nos teores de lignina dos tecidos foliares. Neste trabalho, foram testadas quantidades de Cu (0, 30, 60, 90, 120 g de Cu ha⁻¹) com duas fontes distintas (cuproso e carbonato), juntamente com as caldas fitossanitárias. A aplicação foliar com Cu retardou o progresso da doença diminuindo a severidade e aumentando a produtividade de grãos, porém não alteraram de forma significativa os componentes de rendimento. O teor de lignina presente nas folhas aumentou significativamente com a aplicação de Cu associado às caldas fitossanitárias.

Estudos relataram maiores incrementos nos mecanismos de defesa em plantas tratadas com cobre. Mendoza et al. (2018) observaram aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em extratos de folhas tratadas com Cu e cádmio (Cd) em relação ao controle após 96 horas de tratamento. A ativação na rota dos fenilpropanóides representa uma fonte que protege as plantas de *Prosopis glandulosa* contra estresse oxidativo quando exposto aos tratamentos.

Gao et al. (2008) relataram variação na atividade das peroxidases em folhas e caules de *Jatropha curcas* quando submetidas a altas concentrações de cobre, e nas raízes a diferença foi significativa quando a concentração era calibrada para 200 µmol. O mesmo estudo descreve um aumento gradual na atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas e raízes na concentração de cobre à 400 e 200 µmol, enquanto nos caules a mesma permaneceu inalterada.

Neste estudo, utilizamos como fonte o tetraaminoetanol de cobre. Por se tratar de uma nova tecnologia empregada no mercado, os estudos sobre o efeito dessa fonte no manejo de doenças ainda são escassos.

2.6 Mecanismos de defesa de plantas a patógenos

As plantas são capazes de ativar mecanismos de reconhecimento e defesa contra a entrada de patógenos causadores de doenças. Elas ativam barreiras bioquímicas e reconhecem moléculas eliciadoras patogênicas (DURRANT et al., 2004).

Existem dois tipos de resistência, a local e a induzida. Na resistência local, o mecanismo é caracterizado por uma rápida necrose nas proximidades da infecção, no local ocorre também

um acúmulo de metabólitos tóxicos, como por exemplo as fitoalexinas. A resistência induzida pode ser dividida em resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). Na SAR ela se desenvolve causando reação de hipersensibilidade por acúmulo de ácido salicílico ou compostos sintéticos e na ISR a sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e etileno, sem envolver a produção de proteínas (LOON et al., 1998).

Após o reconhecimento do patógeno, uma das respostas de defesa da planta é a explosão oxidativa, que corresponde à geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (RESENDE et al., 2003). Algumas enzimas são usadas para estabilizar essas EAOs e proteger as células dos danos oxidativos, como é o caso da enzima peroxidase (POX). As peroxidases participam de vários processos fisiológicos importantes, catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, sintetizando lignina (LOON; STRIEN, 1999).

A PAL, fenilalanina amônia-liase, é uma enzima da rota dos fenilpropanoides que leva à formação de lignina e compostos fenólicos (RAES et al., 2003). Ela catalisa a conversão da fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico resultando em fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, que podem conferir maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA et al., 2001).

Outra importante enzima de defesa é a polifenol oxidase (PPO), que está relacionada à oxidação de compostos como ácido ascórbico e fenóis gerando quinonas, que são tóxicas aos organismos invasores. Além disso, esta enzima tem sido associada à lignificação, pois forma ligações cruzadas entre grupos fenólicos e proteínas de parede, pectinas e outros polímeros (MENDONÇA et al., 2003).

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, contendo um grupo fenol caracterizado por um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Estes compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros que são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há ainda aqueles que são grandes polímeros insolúveis, como a lignina e os taninos (TAIZ et al., 2013). Eles possuem ação antifúngica, alguns efeitos inibitórios na germinação de esporos e no crescimento micelial, por exemplo.

A lignina, por sua vez, caracteriza-se por polímeros fenólicos que são resistentes a degradação enzimática, e componentes essenciais na barreira de defesa das plantas (AGRIOS, 2004). Ela se origina de reações que dependem de água e da enzima peroxidase (TAIZ; ZEIGER, 2017).

3. HIPÓTESE

Produto à base de cobre (tetraaminoetanol de cobre) controla a antracnose em soja e induz os mecanismos de defesa nas plantas.

4. OBJETIVOS

Avaliar o efeito do produto à base de cobre (tetraaminoetanol de cobre) no controle da antracnose e nos mecanismos de defesa da soja.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito do tetraaminoetanol de cobre no crescimento micelial de *C. truncatum* e o efeito direto do produto na esporulação e germinação dos esporos;
- Avaliar o efeito do tetraaminoetanol de cobre na severidade da antracnose em casa de vegetação;
- Analisar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POX) de folhas coletadas em casa de vegetação;
- Quantificar os teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel de folhas coletadas em casa de vegetação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento *in vitro*

O experimento *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foi avaliado o efeito do tetraaminoetanol de cobre em diferentes doses no crescimento micelial de *C. truncatum*, utilizando o isolado monospórico LAPS-473 (JÚNIOR et al., 2020), obtido do Laboratório de Análise e Patologia de Sementes (LAPS) da mesma instituição.

Para realização do ensaio foram utilizadas placas de Petri estéreis de 9 cm de diâmetro contendo o meio de cultura Potato Dextrose Agar (BDA). Os tratamentos (Tabela 1) foram adicionados ao meio de cultura. Posteriormente, foi depositado no centro da placa um disco de

5 mm de diâmetro contendo o micélio do isolado LAPS-473. Em seguida, as placas foram acondicionadas em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 1 –Tratamentos e doses utilizados no ensaio *in vitro*.

Nome Comercial	Tratamento	Especificação, i.a*	Dose (mL L⁻¹)
Controle	Controle	--	--
Orkestra [®]	F	fluxapiraxade + piraclostrobina	0,75
Safe [®]	TC-1,25	tetraaminoetanol de cobre	1,25
Safe [®]	TC-2	tetraaminoetanol de cobre	2,0
Safe [®]	TC-3	tetraaminoetanol de cobre	3,0
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-1,25F	--	1,25 + 0,75
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-2F	--	2,0 + 0,75
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-3F	--	3,0 + 0,75

* i.a: ingrediente ativo; volume de calda: 200 L ha⁻¹

Fonte: Da autora (2022).

O crescimento micelial foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia nos dois sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro digital (WEITZ et al., 2001). Após a implantação do ensaio, a avaliação do diâmetro da colônia foi realizada a cada dois dias, sendo finalizada quando o crescimento de pelo menos uma das colônias cobriu completamente o diâmetro da placa. O experimento foi composto por oito tratamentos e seis repetições, sendo a parcela experimental composta por uma placa de Petri. O experimento foi realizado duas vezes visando a repetibilidade dos resultados.

Após as avaliações de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foram realizados testes de contagem e viabilidade (germinação) dos esporos em cada parcela experimental. Para a contagem dos esporos foram adicionados nas placas aproximadamente 10 mL de água esterelizada, sendo os mesmos desprendidos com o auxílio de uma alça de drigalski. Uma alíquota de 50 μL foi depositada na câmara de Newbauer onde foi realizada a contagem de esporos em cada quadrante. Para a avaliação da germinação, a suspensão foi depositada em placa contendo meio ágar-água e observada a viabilidade dos esporos após 12 horas de incubação em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (avaliação de 40 esporos por placa). Foi considerado germinado o conídio cujo tubo germinativo apresentava 50% do seu tamanho.

5.2 Experimento em casa de vegetação

O ensaio em casa de vegetação foi realizado no DFP/UFLA. A cultivar utilizada na condução do experimento foi a Monsoy 6410 IPRO, uma cultivar com alta performance em diferentes ambientes de produção, ampla janela de semeadura, excelente engalhamento, compensação de plantas e boa arquitetura. Foram avaliados oito tratamentos (Tabela 2) com quatro repetições, totalizando 32 vasos, sendo cada parcela experimental composta por duas plantas por vaso. Os vasos foram dispostos de modo aleatório após as aplicações. O solo utilizado no experimento foi previamente autoclavado. As avaliações das doenças foram realizadas em intervalos de 5 dias.

Tabela 2 – Tratamentos aplicados na soja em casa de vegetação.

Nome Comercial	Tratamento	Especificação, i.a*	Dose (mL L ⁻¹)
Controle	Controle	--	--
Orkestra [®]	F	fluxapiraxade + piraclostrobina	0,75
Safe [®]	TC-1,25	tetraaminoetanol de cobre	1,25
Safe [®]	TC-2	tetraaminoetanol de cobre	2,0
Safe [®]	TC-3	tetraaminoetanol de cobre	3,0
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-1,25F	--	1,25 + 0,75
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-2F	--	2,0 + 0,75
Safe [®] + Orkestra [®]	TC-3F	--	3,0 + 0,75

* i.a: ingrediente ativo; volume de calda: 200 L ha⁻¹

Fonte: Da autora (2022).

5.2.1 Inoculação de *Colletotrichum truncatum*

Para a preparação do inóculo foi utilizada a metodologia adaptada de Pereira et al. (2014). Vagens de soja foram previamente autoclavadas em tubos de ensaio, submersas em 10 mL de meio Potato Dextrose Ágar (BDA). O isolado monospórico de *C. truncatum* utilizado foi o LAPS-473. O fungo foi cultivado por 5 dias em meio de cultura BDA e posteriormente, os discos de micélio com aproximadamente 5 mm foram transferidos para os tubos contendo as vagens. Os tubos foram acondicionados em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 ± 1 °C por aproximadamente 15 dias. Após este período, foram adicionados 2 mL de água destilada esterilizada nos tubos, os quais foram submetidos à agitação para maior

desprendimento dos esporos. A suspensão obtida foi calibrada para a concentração de 1×10^6 conídios por mL. Posteriormente, foi adicionada ágar-água (0,2%) à suspensão para maior aderência dos esporos na inoculação. A suspensão foi pulverizada nas plantas em estágio V7 com pulverizador manual pressurizado. A inoculação do patógeno foi realizada 3 dias após a aplicação dos produtos.

5.2.2 Aplicação dos tratamentos

O produto à base de cobre (tetraaminoetanol de cobre) foi testado em diferentes doses, isolado e com uma mistura de fluxapiroxade + piraclostrobina (Tabela 2). A aplicação dos diferentes tratamentos foi realizada aproximadamente às 17h no estágio V7 (fase vegetativa final, estágio anterior ao surgimento de flores).

As plantas foram pulverizadas com os tratamentos descritos na Tabela 2. Para a aplicação foi utilizado um pulverizador manual pressurizado. O cálculo para determinação das doses em mL L⁻¹ foram baseadas no volume de calda de 200 L ha⁻¹.

5.2.3 Avaliação de severidade da doença

As avaliações de severidade da antracnose foram realizadas de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997) em intervalos de 5 dias a partir do aparecimento dos sintomas, totalizando 4 avaliações.

A partir dos resultados foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) conforme a fórmula de Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i-1} - T_i)$$

No qual:

AACPD= área abaixo da curva de progresso da doença;

Y_i= proporção da doença na i-ésima observação;

T_i= tempo em dias na i-ésima observação;

n= número total de observações

5.3 Análises bioquímicas

Os tratamentos que apresentaram menor severidade da doença em casa de vegetação (tetraaminoetanol de cobre 2,0 mL L⁻¹ e tetraaminoetanol de cobre 3,0 mL L⁻¹) foram selecionados para as análises bioquímicas.

As amostras foram constituídas pelo 1º trifólio desenvolvido da soja e foram coletadas às 0 h (momento antes da primeira aplicação dos tratamentos), 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos. Após 3 dias de aplicação (72 h) foi realizada a inoculação do patógeno (*C. truncatum*) e novamente foram realizadas coletas de folhas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno, totalizando 7 tempos de coleta.

Imediatamente após a coleta das folhas, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultra freezer a – 80 °C até a maceração. Após realizada a maceração as amostras foram divididas em microtubos.

Para a quantificação de compostos fenólicos solúveis totais foi feita a liofilização de algumas amostras. Para a quantificação das enzimas, as amostras foram homogeneizadas com polivinilpirrolidona (PVP) 1% e tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) em vórtex. Para cada grama de tecido foliar macerado foram adicionados 3 mL do tampão. As amostras foram centrifugadas a 4 °C e 14.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante coletado para determinar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO).

5.3.1 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A enzima fenilalanina amônia-liase foi determinada conforme metodologia de Zucker (1965). A solução foi constituída por 5 µL do extrato enzimático, 145 µL de Tris-HCl a 100 mM (pH 8,8) e 50 µL de L-fenilalanina a 50 mM. A solução foi incubada a 37 °C por 20 minutos e a leitura da absorbância foi de 280 nm. Para calcular a atividade da PAL foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5000 mM⁻¹ cm⁻¹.

5.3.2 Peroxidase (POX)

A metodologia para determinar a atividade da POX foi realizada de acordo com Biemelt et al. (1998). A reação foi constituída por 5 µL do extrato enzimático, 30 µL de guaiacol a 50

mM e 30 μ L de peróxido de hidrogênio a 250 mM. Após a incubação a 30 °C por 5 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 480 nm (URBANEK et al., 1991). O coeficiente de extinção molar de 1,235 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da enzima.

5.3.3 Polifenol oxidase (PPO)

A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar & Mishra (1976). Para a reação foram adicionados 5 μ L do extrato enzimático, 155 μ L de fosfato de potássio a 70 mM (pH 7,0) e 40 μ L de catecol a 20 mM. Após incubação a 30 °C por 5 minutos, a absorbância foi medida a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da enzima.

5.3.4 Proteína total

A proteína total de cada extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina.

5.3.5 Determinação de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

Para determinar os compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel foi utilizada a metodologia adaptada de Spanos & Wrolstad (1990). Aproximadamente 30 mg de tecido foliar liofilizado foram homogeneizados com metanol 80% e agitados *overnight* em agitador rotativo. As amostras foram centrifugadas a 25 °C a 14.000 rpm por 5 minutos. Para quantificar os compostos fenólicos totais foi utilizado o sobrenadante e para a lignina, o precipitado.

O sobrenadante foi homogeneizado com 150 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N por 5 minutos. Após este período, foram adicionados 150 μ L de Na_2CO_3 a 1M por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram diluídas com 1 mL de água destilada e permaneceram à temperatura ambiente por 1 hora. Esta reação foi determinada a 725 nm em espectrofotômetro. Os compostos fenólicos totais (μg do equivalente de ácido clorogênico mg^{-1} de tecido seco) foram calculados com base na curva padrão do ácido clorogênico.

Para determinar o teor de lignina solúvel foi utilizado o precipitado, homogeneizado com metanol 80%. Após a centrifugação, o conteúdo foi seco em estufa a 65 °C por 15 horas.

Após este período, foi adicionada uma solução de ácido tioglicólico: HCl 2M (1:10), os quais foram acondicionados em banho-maria a 100 °C por 4 horas. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante, adicionados 1,5 mL de água ultrapura e descartado o sobrenadante novamente. O precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M. As amostras permaneceram em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl P.A. Após período de precipitação (4 horas a 4 °C), foi realizada nova centrifugação, descarte do sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

5.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA) utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011). As variáveis significativas no teste F da ANAVA foram submetidas ao teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), viabilidade dos esporos e germinação

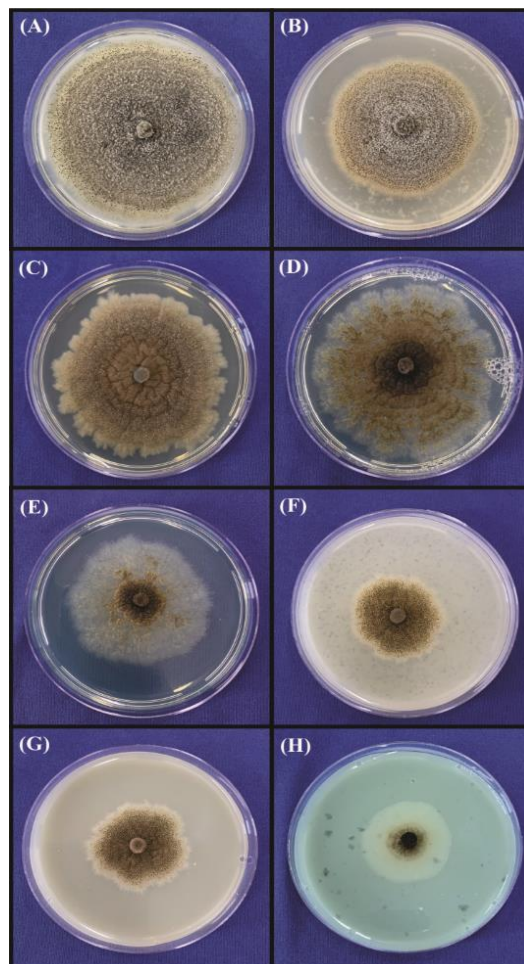
Os resultados das avaliações do IVCM apresentaram diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao controle. O tratamento que apresentou menor crescimento micelial na placa foi o tetraaminoetanol de cobre na maior dose + fungicida (3 mL L⁻¹ + 0,75 mL L⁻¹), seguido dos outros tratamentos que continham a mistura de fungicida com a fonte de cobre (Figura 1, Figura 2). Hoffmann (2019) relatou que a mistura de fosfitos de cobre com fungicidas sistêmicos inibiu o crescimento micelial de *C. truncatum* em condições *in vitro*, diminuindo também a esporulação e a germinação.

Embora algumas placas tenham apresentado crescimento da colônia, a diferença na coloração e na superfície do micélio do fungo foi observada (Figura 1D e E). Apesar do

crescimento micelial, as placas que continham o tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 mL L^{-1} e 3 mL L^{-1} não apresentaram produção de esporos e conseqüentemente nenhuma germinação.

O efeito fungistático do cobre sobre patógenos é identificado em vários estudos que apresentaram ação direta do produto na inibição da esporulação e no desenvolvimento de fungos (KENNY et al., 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2012) e também na forma de filmes protetores em frutos contra o ataque de *C. gloeosporioides* (NGUYEN et al., 2020). Já o efeito fungicida ou fungitóxico é morte completa das estruturas do patógeno e não somente sua inibição temporária.

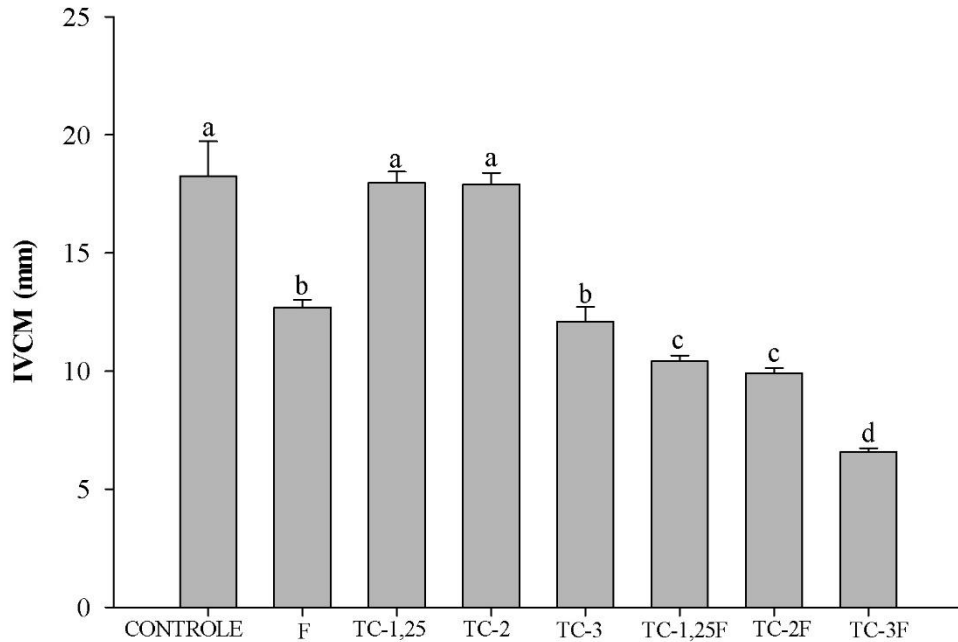
Figura 1 – Fotografias de colônias de *Colletotrichum truncatum* em placas com diferentes tratamentos.



Legenda: (A) Controle; (B) Fungicida; (C) Tetraaminoetanol de cobre ($1,25 \text{ mL L}^{-1}$); (D) Tetraaminoetanol de cobre (2 mL L^{-1}); (E) Tetraaminoetanol de cobre (3 mL L^{-1}); (F) Tetraaminoetanol de cobre ($1,25 \text{ mL L}^{-1}$) + Fungicida; (G) Tetraaminoetanol de cobre (2 mL L^{-1}) + Fungicida; (H) Tetraaminoetanol de cobre (3 mL L^{-1}) + Fungicida.

Fonte: Da autora (2022).

Figura 2 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum truncatum* em placas com diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; (F) Fungicida; (TC-1,25) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹; (TC-2) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹; (TC-3) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹; (TC-1,25F) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-2F) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-3F) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹ + Fungicida. Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

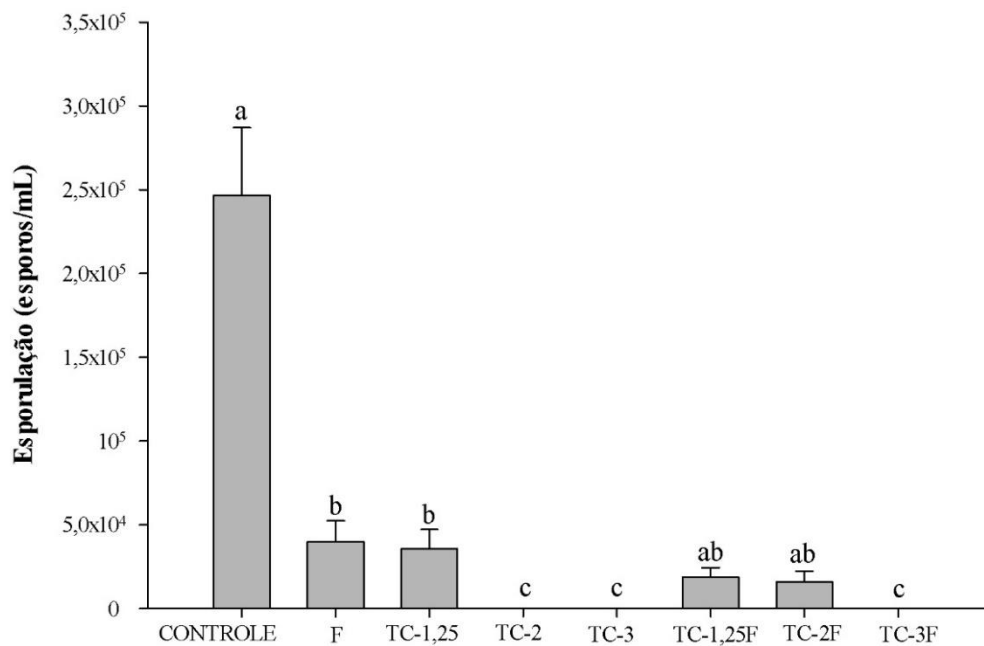
Além da medição do crescimento micelial foi avaliada a produção e a viabilidade de esporos. Foi possível observar que as doses 2 mL L⁻¹ e 3 mL L⁻¹ de cobre apresentaram crescimento da colônia, porém sem produção de esporos (Figuras 3 e 4).

Os tratamentos que inibiram a germinação apresentaram uma ação protetora nas plantas, pois, agiram na infecção e conseqüentemente na colonização do patógeno no hospedeiro. Por outro lado, aqueles tratamentos que inibiram o crescimento micelial apresentaram um efeito curativo agindo diretamente no desenvolvimento do patógeno após penetração nos tecidos (HOFFMANN, 2019; TÖFOLI et al., 2012).

Isso explica os resultados encontrados nas avaliações de severidade da doença em casa de vegetação. Os mesmos tratamentos que apresentaram menor índice de severidade da doença foram aqueles que não apresentaram produção de esporos no teste *in vitro*, indicando que a fonte tetraaminoetanol de cobre teve ação protetora nas plantas.

Estudos envolvendo o gênero *Colletotrichum* em outras culturas, apontam efeito direto de fungicidas sistêmicos na inibição da esporulação e germinação dos esporos quando aplicados de forma isolada e em misturas com sulfato de cobre (MORAL et al., 2018; VELOSO et al., 2021). Souza Filho (2013) relatou que a mistura de oxicloreto de cobre + mancozeb inibiu a germinação de esporos de *C. lindemuthianum* na concentração de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o tratamento com óxido cuproso a sensibilidade era menor, inibindo a germinação em concentrações de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

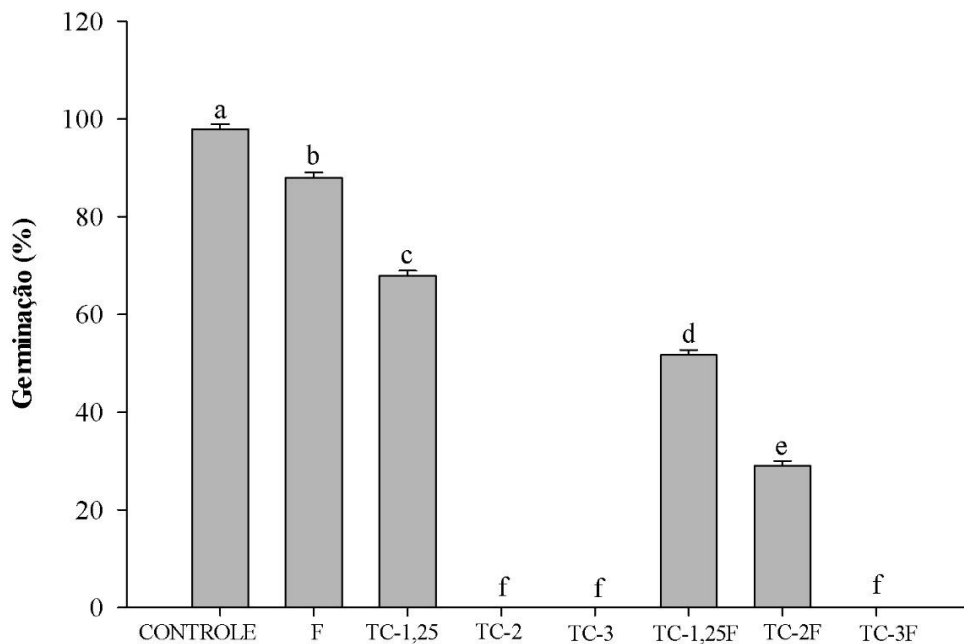
Figura 3 – Produção de conídios (esporos mL^{-1}) do isolado de *Colletotrichum truncatum* submetido a diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; (F) Fungicida; (TC-1,25) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L^{-1} ; (TC-2) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L^{-1} ; (TC-3) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L^{-1} ; (TC-1,25F) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L^{-1} + Fungicida; (TC-2F) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L^{-1} + Fungicida; (TC-3F) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L^{-1} + Fungicida. Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

Figura 4 – Porcentagem de germinação de conídios do isolado de *Colletotrichum truncatum* submetido a diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; (F) Fungicida; (TC-1,25) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹; (TC-2) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹; (TC-3) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹; (TC-1,25F) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-2F) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-3F) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹ + Fungicida. Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

6.3 Severidade da antracnose em casa de vegetação

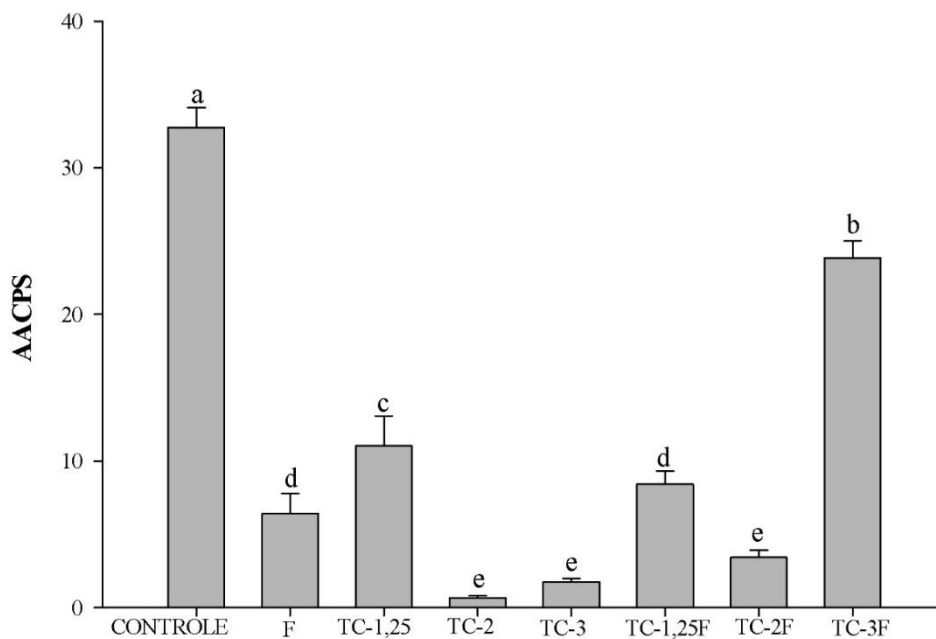
Diferenças significativas foram observadas entre as médias da área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPS) avaliada em casa de vegetação (Figura 5). O tratamento que apresentou menor AACPS foi o tetraaminoetanol de cobre na dose de 2 mL L⁻¹, seguido do tratamento de tetraaminoetanol na dose de 3 mL L⁻¹ e da mistura com o fungicida na dose de 2 mL L⁻¹.

Dentre as diversas práticas de manejo para o controle da antracnose, o uso preventivo de fontes de cobre pode atuar fornecendo nutrição mineral, induzindo a resistência no hospedeiro e causando toxicidade direta ao patógeno (PEREIRA, 2018). Exemplo disso é a fonte utilizada nesse estudo, tetraaminoetanol de cobre. O produto utilizado controlou a doença em casa de vegetação (Figura 5) em até 98%, inibiu o crescimento micelial em 64%, e esporulação e germinação em 100% quando aplicado na dose de 2 e 3 mL L⁻¹.

O uso de misturas de cúpricos com fungicidas sistêmicos é uma alternativa de manejo utilizada como estratégia anti-resistência. Xavier et al. (2019) comprovam a eficiência da mistura de Unizeb Gold[®] (1,5 kg ha⁻¹), Difere[®] (0,5 L ha⁻¹) e NHT[®] Copper Super (0,109 L ha⁻¹) para o controle da ferrugem asiática e de doenças de final de ciclo na cultura da soja. Silva Júnior et al. (2021) verificaram um aumento nos teores de lignina e na atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) em tratamentos com fosfitos de cobre, potássio e manganês, além de redução na severidade da antracnose e transmissão de *C. truncatum* via sementes.

Na identificação do efeito fungistático sobre o patógeno, Mamatha et al. (2020) observaram inibição do crescimento micelial de *C. truncatum* em 93,58% no tratamento contendo oxicloreto de cobre.

Figura 5 – Área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPS) avaliada em soja conduzida em casa de vegetação.



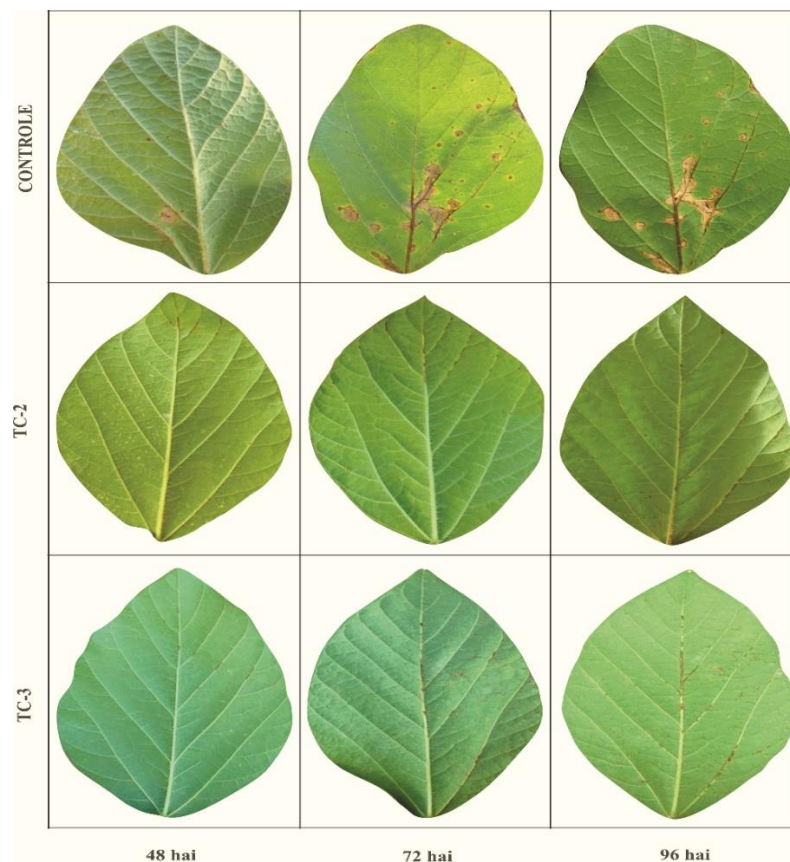
Legenda: Controle; (F) Fungicida; (TC-1,25) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹; (TC-2) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹; (TC-3) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹; (TC-1,25F) Tetraaminoetanol de cobre 1,25 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-2F) Tetraaminoetanol de cobre 2 mL L⁻¹ + Fungicida; (TC-3F) Tetraaminoetanol de cobre 3 mL L⁻¹ + Fungicida. Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

Na Figura 6 é possível observar sintomas característicos nas nervuras causadas pela infecção do fungo *C. truncatum*. As folhas apresentam diferentes níveis de colonização horas após a inoculação do patógeno. Os primeiros sintomas foram observados 48 horas após a inoculação nas plantas do tratamento controle. No decorrer das horas, as necroses começaram a atingir a nervura principal das folhas e até mesmo as hastes das plantas. Como pode ser observado na Figura 6, os tratamentos TC-2 e TC-3 (tetraaminoetanol de cobre aplicado nas dose de 2,0 mL L⁻¹ e 3,0 mL L⁻¹, respectivamente) apresentaram menor severidade às 48, 72 e 96 horas após inoculação.

O fungo *C. truncatum* além de necrosar folhas e hastes das plantas também pode infectar vagens e causar danos econômicos expressivos em lavouras infectadas, exigindo assim um manejo adequado do sistema de produção.

Figura 6 – Fotografias mostrando a severidade da antracnose em folhas de soja até o quarto dia, após a inoculação de *C. truncatum*.



Legenda: (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de 2,0 mL L⁻¹; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de 3,0 mL L⁻¹; hai: horas após inoculação.

Fonte: Da autora (2022).

6.4 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

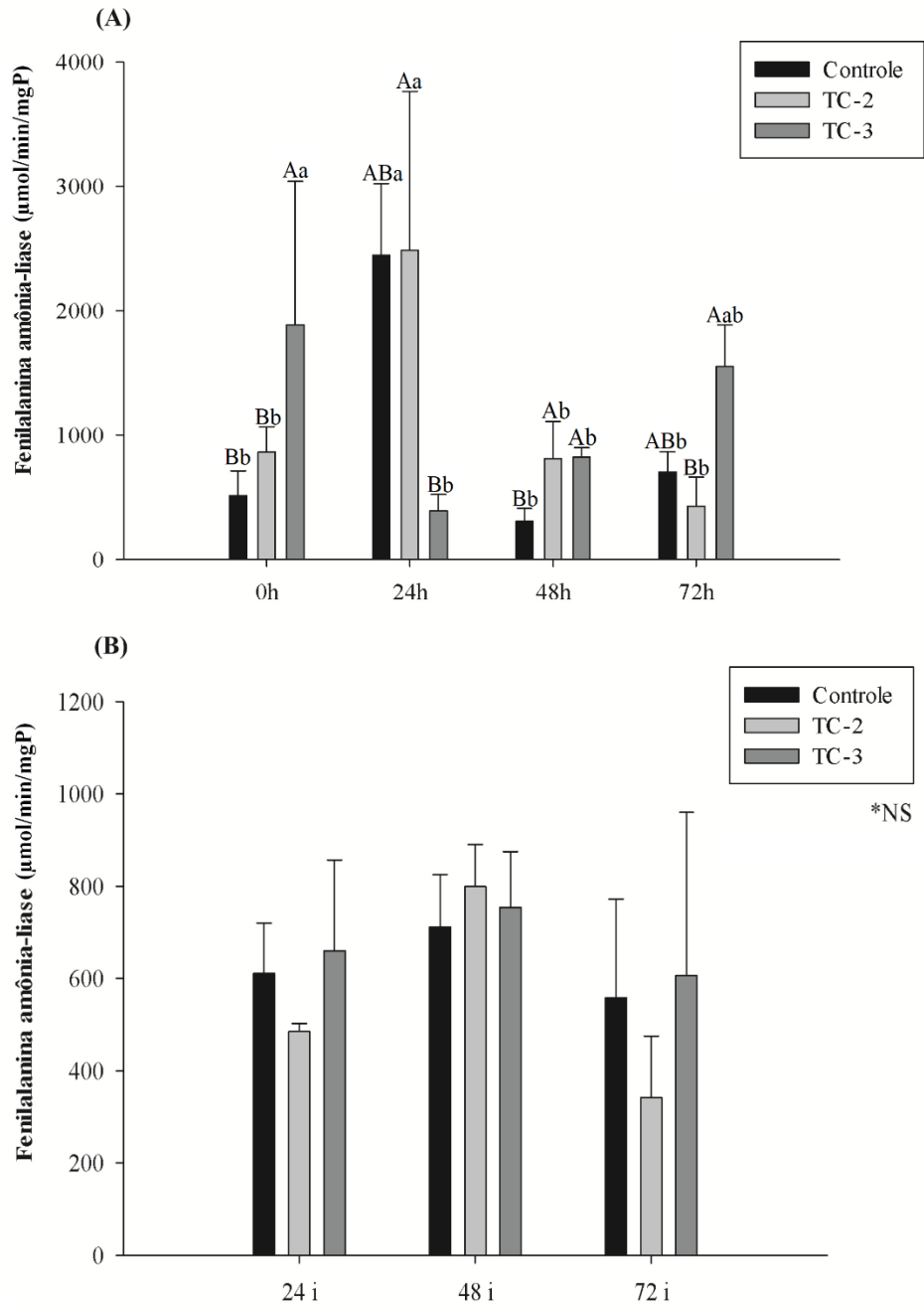
Os dados da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) de folhas coletadas após aplicação de tetraaminoetanol de cobre apresentaram diferença significativa 72 horas após a aplicação para a dose de 3 mL L⁻¹ (Figura 7). Após a inoculação do patógeno não houve diferença significativa entre os tratamentos e os tempos de coleta (Apêndice A).

A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima da rota dos fenilpropanóides e está envolvida na formação de componentes da parede celular como, por exemplo, a lignina (RAES et al., 2013).

Bruzamarello et al. (2018) relataram em seus estudos que a atividade da PAL atingiu seu nível máximo de produção 48 horas após a aplicação de fosfito de cobre em plantas de soja, sendo observado aumento significativo 24 horas após aplicação do produto. Alguns autores relataram também que a aplicação de cobre em altas doses desencadeou aumento de 110% da atividade de PAL em plantas de tremoço (CHMIELOWSKA et al., 2009; JOUILI; FERJANI, 2003).

Por se tratar de uma enzima responsável pela estruturação da parede celular, reconhecer a atividade e ativação dessa enzima pode ajudar no embasamento para tomada de decisões acerca de métodos de controle de doenças em plantas.

Figura 7 – Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹



Legenda: (A): tempos de coleta após aplicação do produto; (B): tempos de coleta após a inoculação do patógeno; Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo, enquanto letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre diferentes tempos no mesmo tratamento; (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de 2,0 mL L⁻¹; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de 3,0 mL L⁻¹; *NS: não significativo.

Fonte: Da autora (2022).

6.5 Peroxidase (POX)

Para a atividade da enzima peroxidase (POX) não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8; Apêndice B).

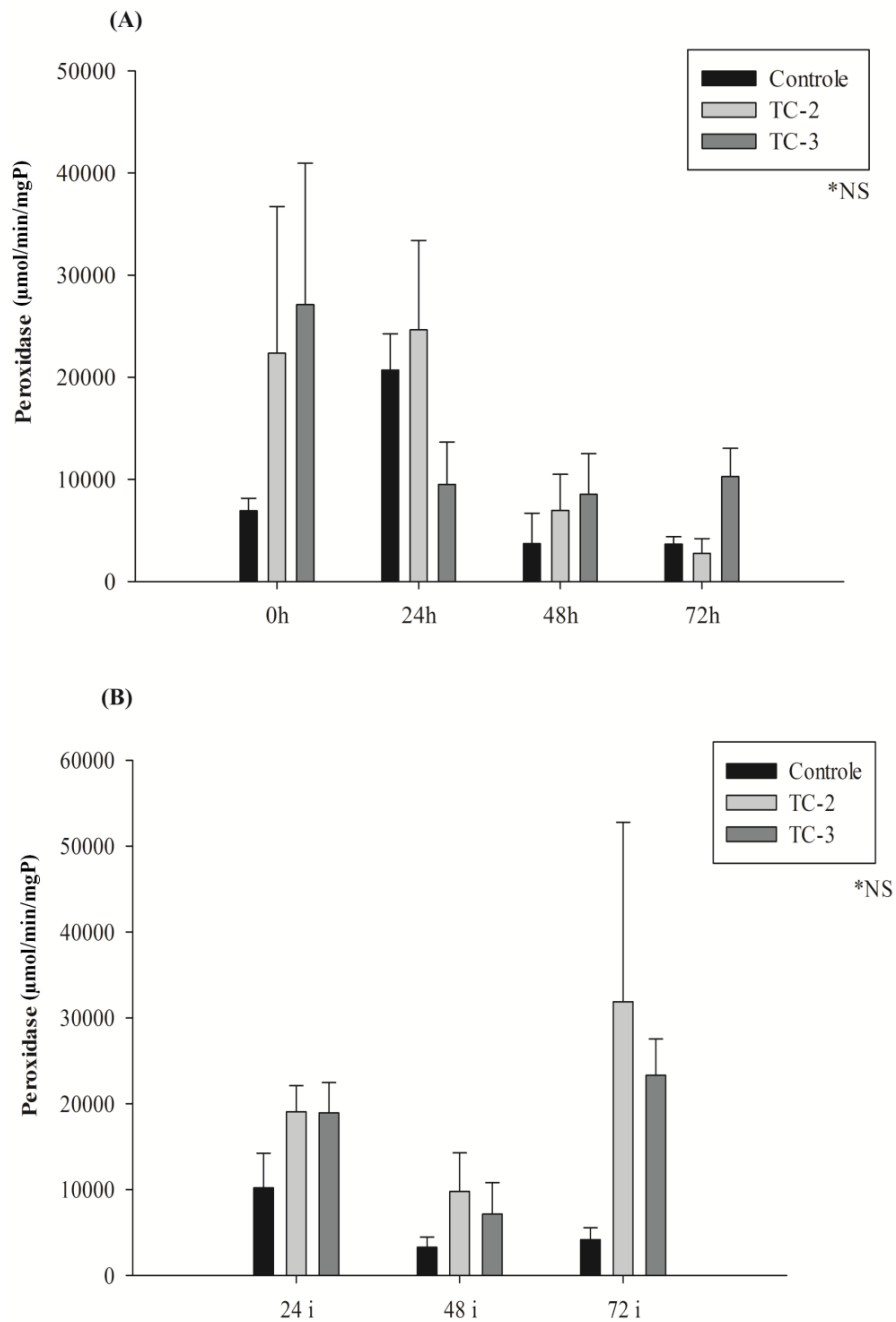
Chmielowska (2009) reportou em seu estudo que não houve indução da atividade da POX em soja após as 48 horas da aplicação de cobre. Por ser uma enzima responsável por estabilizar as espécies reativas de oxigênio (EAOs) devido a explosão oxidativa causada pelo reconhecimento ao ataque de patógenos (RESENDE et al., 2003), compreende-se que a POX necessita de um maior período para a ativação e produção. Contudo, possivelmente o período de 72 horas tanto após a aplicação dos produtos quanto a inoculação não influenciaram significativamente a atividade da peroxidase em soja.

Toqueer et al. (2020) constataram ativação das enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase), POX e CAT (catalase) após aplicação de nanopartículas de CuO na concentração de 550 ppm e redução significativa da atividade enzimática para o aumento da concentração em 800 ppm em plantas de milho.

De acordo com Hu et al. (2013), nanopartículas de cobre possuem atividade semelhante à peroxidase agindo como um mimetizador enzimático.

Por se tratar de uma enzima de defesa, a POX é responsável por oxidar e polimerizar compostos fenólicos em substâncias como a lignina, podendo interferir assim na colonização do patógeno.

Figura 8 – Atividade da enzima peroxidase (POX) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹



Legenda: (A): tempos de coleta após aplicação do produto; (B): tempos de coleta após inoculação do patógeno; (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de $2,0 \text{ mL L}^{-1}$; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de $3,0 \text{ mL L}^{-1}$; *NS: não significativo.

Fonte: Da autora (2022).

6.6 Polifenol oxidase (PPO)

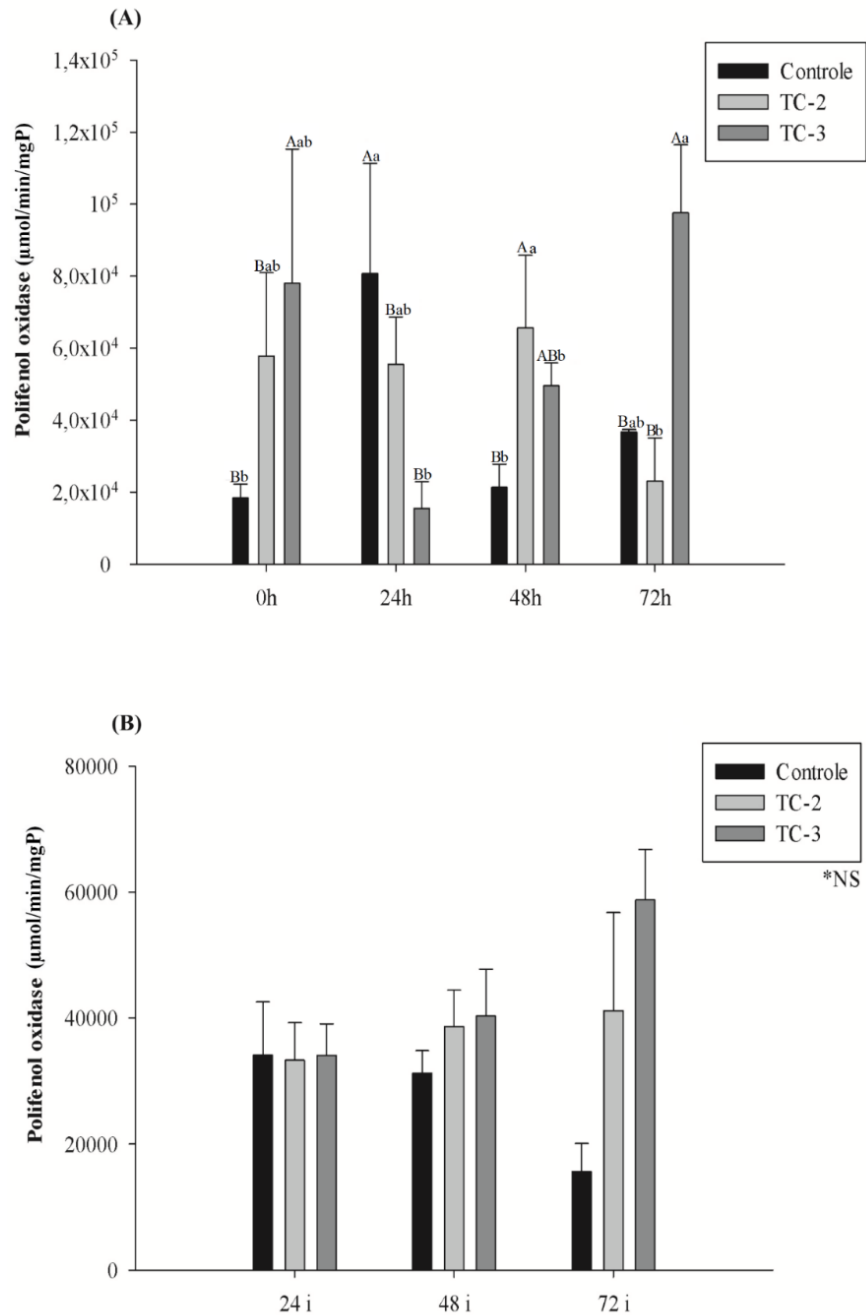
As médias de atividade da PPO diferiram significativamente entre os tratamentos para as plantas que receberam a aplicação do tetraaminoetanol de cobre e que não foram inoculadas

com o patógeno (Figura 9). Maior atividade enzimática foi verificada às 72 horas após a aplicação do produto na dose de 3 mL L⁻¹ (Apêndice C).

A polifenol oxidase também está envolvida na síntese de compostos fenólicos responsáveis pela defesa constitutiva das plantas. A aplicação de nanopartículas de Cu-quitosana na cultura do milho aumentou a atividade da PPO em tratamentos com nanopartículas (0,12 e 0,16%) quando comparadas ao controle (água), quitosana total e tratamentos com CuSO₄ 24 horas após aplicação (CHOUDHARY et al., 2017).

Ma et al. (2020) estudaram os efeitos das aplicações de cobre em soja infectada com a síndrome da morte subida, doença causada pelo fungo *Fusarium virguliforme*. Foi observado que o Cu iônico elevou a atividade da PPO da parte aérea em 83%, mas não alterou significativamente a atividade enzimática nas raízes.

Figura 9 – Atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹



Legenda: (A): tempos de coleta após aplicação do produto; (B): tempos de coleta após a inoculação do patógeno; Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo, enquanto letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre diferentes tempos no mesmo tratamento; (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de 2,0 mL L⁻¹; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de 3,0 mL L⁻¹; *NS: não significativo.

Fonte: Da autora (2022).

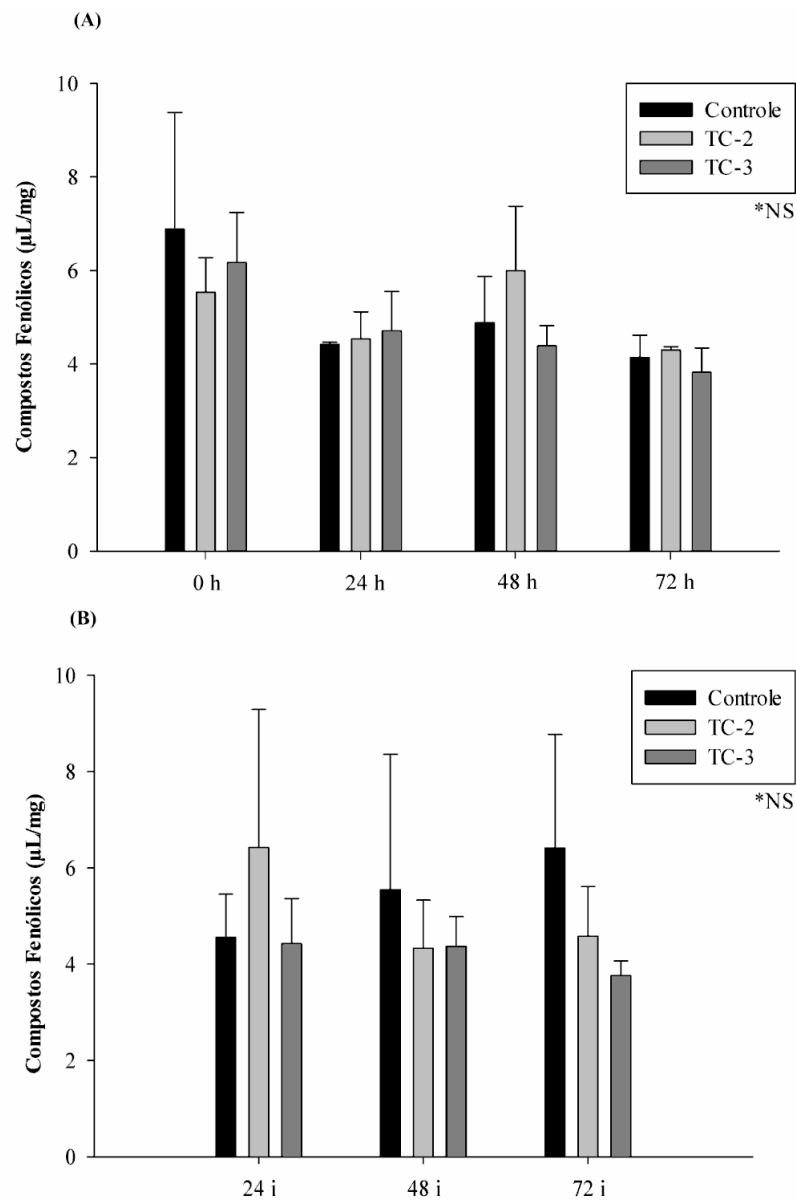
6.7 Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

Não foi constatada diferença entre os tratamentos quanto aos teores de compostos fenólicos solúveis totais (Figura 10; Apêndice D). Por outro lado, os teores de lignina solúvel diferiram significativamente entre os tratamentos, sendo o tratamento tetraaminoetanol de cobre na dose de 2 mL L⁻¹ com o maior teor desse metabólito às 72 horas após a sua aplicação (Figura 11; Apêndice E).

Lin et al. (2005) observou um aumento no teor de lignina em raízes de soja após aplicação de cobre em baixas doses. Nair & Chung (2014) relataram que a exposição a 100, 200, 400 e 500 mg L⁻¹ de nanopartículas de CuO aumentou significativamente o nível de peróxido de hidrogênio, a atividade da POX e o conteúdo de lignina das raízes, contribuindo para o desenvolvimento da raiz em plântulas de soja.

A lignina é um polímero complexo e ramificado de compostos fenólicos e desempenha papel fundamental na resposta de defesa das plantas (MAJUMDAR et al., 2021). Ela é sintetizada a partir da via dos fenilpropanóides, mesma via responsável pela síntese das enzimas citadas anteriormente. Apesar de não significativo para teores de compostos fenólicos solúveis totais, o aumento na produção de lignina solúvel indica resultados promissores no estudo da molécula de tetraaminoetanol de cobre. Sugere-se que a aplicação do produto pode conferir maior proteção à soja e inibir a manifestação da antracnose.

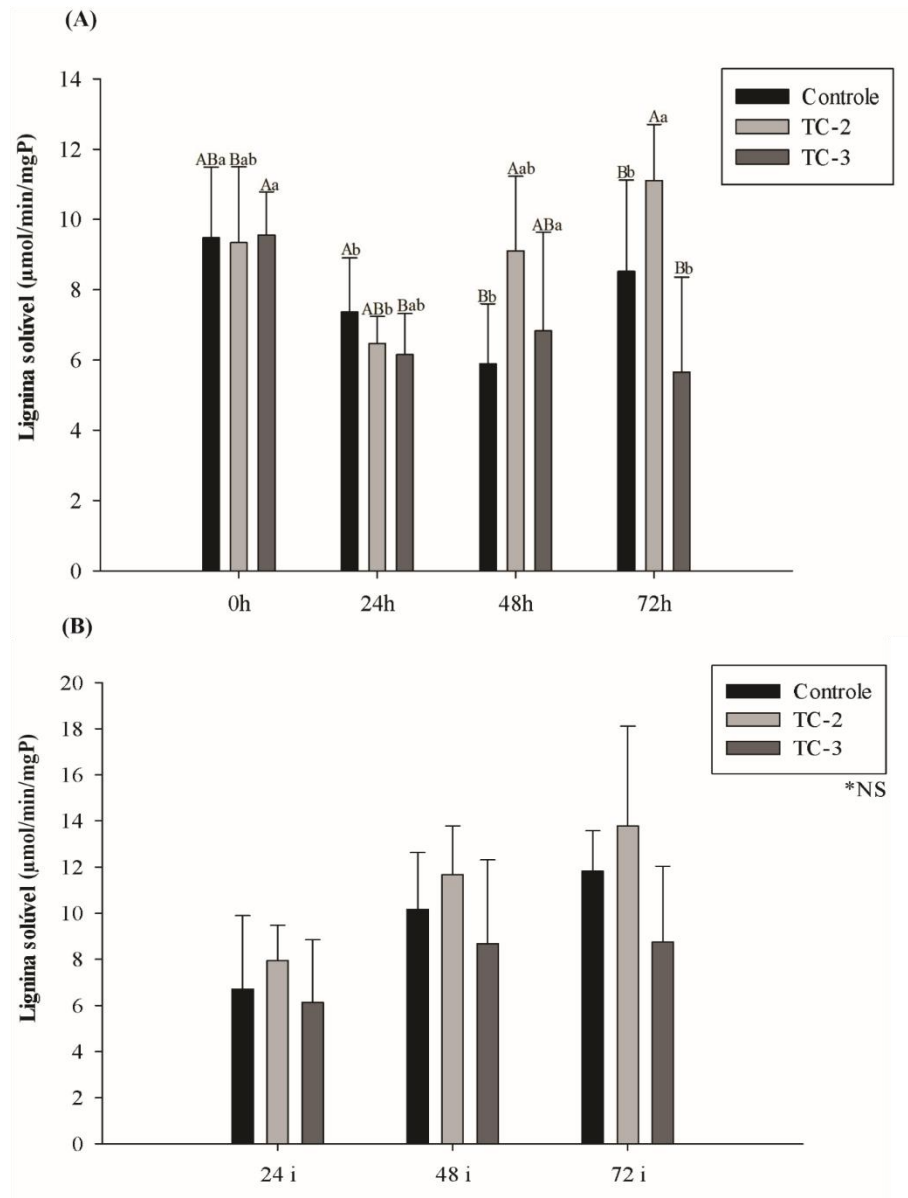
Figura 10 – Teores de compostos fenólicos solúveis totais em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹



Legenda: (A): tempos de coleta após aplicação do produto; (B): tempos de coleta após inoculação do patógeno; (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de $2,0 \text{ mL L}^{-1}$; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de $3,0 \text{ mL L}^{-1}$; *NS: não significativo.

Fonte: Da autora (2022).

Figura 11 – Teores de lignina solúvel em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de $2 \text{ e } 3 \text{ mL L}^{-1}$



Legenda: (A): tempos de coleta após aplicação do produto; (B): tempos de coleta após a inoculação do patógeno; Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo, enquanto letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre diferentes tempos no mesmo tratamento; (TC-2) tetraaminoetanol de cobre na dose de $2,0 \text{ mL L}^{-1}$; (TC-3) tetraaminoetanol de cobre na dose de $3,0 \text{ mL L}^{-1}$; *NS: não significativo.

Fonte: Da autora (2022).

7. CONCLUSÃO

No teste *in vitro* a fonte de cobre (tetraaminoetanol de cobre) nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹ apresentou efeito inibitório no desenvolvimento de *C. truncatum* pois não foram observadas produção de esporos nas placas com os respectivos tratamentos.

Com base nas análises de severidade, observou-se que a mesma fonte de cobre controlou a antracnose em soja em 98% para a dose de 2 mL L⁻¹ e 95% para a dose de 3 mL L⁻¹, atuando também na ativação dos mecanismos de defesa nas plantas aumentando a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) e os teores de lignina solúvel.

O estudo sugere que a molécula tetraaminoetanol de cobre aplicada em soja teve efeito protetivo nas folhas, inibindo a esporulação e colonização do patógeno nos tecidos do hospedeiro e contribuiu para a ativação de mecanismos pré-existentes.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da soja**. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2. p.569-588, 2005.
- AZEVEDO, L. A. S. Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional. Campinas, SP: **Emopi Gráfica Editora Ltda**. 2003.
- AZEVEDO, L. A. S. Fungicidas Sistêmicos. Teoria e prática. Campinas, SP: **Emopi Gráfica Editora Ltda**. 2007.
- ARRUDA, R. S. et al. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n.2, p. 164-172, 2012.
- BAIBAKOVA, E. V. et al. Modern Fungicides: Mechanisms of Action, Fungal Resistance and Phytotoxic Effects. **Annual Research e Review in Biology**, p. 1-16. 2019.
- BASSETO, M. A.; CERESINI, P. C.; VALÉRIO FILHO, W.V. Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-11A em função de doses de potássio. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 56-62, 2007.
- BASSO, P.; BONALDO, S. M.; RUFFATO, S. Avaliação de fungicidas no controle de antracnose e mancha alvo, e no rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 191-199, 2015.
- BEDIN, E. Aplicações foliares de cobre no manejo da ferrugem-asiática da soja. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)**. Universidade de Passo Fundo. 2018.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BORGES, S. C.; SIMOES, F. S. B.; TRINDADE, S. L. A relação entre a produção de soja e o PIB no município de dom Pedrito/RS. **Revista de Gestão do Agronegócio da Unipampa**, v. 2, p. 2, 2017.
- 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**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, C. A.; HOLLIER, C.; KELLY, H.; Principles of fungicide resistance. **United Soybean Board (USB)**, 2020.
- BRENT, K. J., HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk. **FRAC Monograph No 2**, Global Crop Protection Federation, Brussels, 48p, 1998.
- BRUZAMARELLO, J. et al. Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Revista Cultura Agronômica**, v. 27, n. 3, 263-273. (2018).
- CHALFOUN, S. M. Aspectos da utilização de fungicidas cúpricos na cultura do cafeeiro: revisão de literatura. 2. ed. **Lavras: Griffin**, 1999. 88 p.

- CHEN, Y. & WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 89, n. 12, p. 1268- 1272. 2005.
- CHMIELOWSKA, J.; DECKERT, J.; DIAZ, J.O.S. É. Activity of peroxidases and phenylalanine ammonia-lyase in lupine and soybean seedlings treated with copper and an ethylene inhibitor. **Biol Lett**, v. 45, p. 59-67, 2008.
- CHOUDHARY, R.C. et al. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Sexto levantamento da safra 2021/22 de grãos / Março de 2022**. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em 29 de março de 2022.
- COSTA, I. F. D.; BALARDIM, R. S.; MEDEIROS, L. A.; BAYER, T. M. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Scwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1684-1688, 2006.
- DALCORSO, G.; MANARA, A.; PIASENTIN, S.; FURINI, A. Elementos nutritivos de metal em plantas. **Metalômica**. (2014).
- DELP, C. 1. Fungicide resistance in North America. **SI. Paul: APS Press**, 1988. 133p.
- DEZEM, M. A.; FURLAN, C. S.; SOBRINHO, W. C. A.; PENEDO, R. **Manejo de Resistência a Fungicidas**. Piracicaba, 2019.
- DIAS, M.D. et al. Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 459, 2019.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 18-23, 2016.
- DOMINGUES, M. S.; BERMANN, C.; MANFREDINI, S. A produção de soja no Brasil e sua relação com o desmatamento na amazônia. **Revista Presença Geográfica**, v. 1, p. 32-47, 2014.
- DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, v.78, n. 4, p. 473-477, 1988.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 185-209, 2004
- FERREIRA, D. F.; Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FRAC. List of pathogenic organisms resistant to disease control agentes. **Fungicides resistance action committee**, 2013. Disponível em <https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi.fungicides/group/list-ofresistant-plant-pathogens_2012-edition.pdf?sfvrsn=ef18469a_2>. Acesso em 03 julho de 2020.
- FREI, M. LIGNIN: Characterization of a Multifaceted Crop Component. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

- 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. 117-22, 2008.
- GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: Rondônia **EMBRAPA-CPAF** (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46, 1999. 32p.
- GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente**, 2002.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. **Manual de fitopatologia**, p. 657- 676, 2016.
- GODOY, C.V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation/Diagrammatische Boniturskalen für Bohnenkrankheiten: Entwicklung und Validation. **Plant Diseases and Protection**, p. 336-345, 1997.
- GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus. p.87-95. In: Fungicides resistance in crop protection: Risk and management. T. S. Thind. Ed. CABI **Publishing Wallingford**. U.K. 2012.
- GRAHAM, R. D. Effect of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. **Advances in Botanical Research.**, v. 10, p. 221-276, 1983.
- GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. **Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants**. In: MORTEVEDT, J. J.; COX, F. R.; SCHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. 2. ed. Madison, Wisc.: Soil Science Society of America, 1991. P. 329-370.
- HARTMAN, G. L.; CHANG, H.-X.; LEANDRO, L. F. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. **Crop Protection**, v. 73, p. 60-66, 2015.
- HARTMAN, G. L., RUPE, J. C., SIKORA, E. J., DOMIER, L. L., DAVIS, J. Á., STEFFEY, K. L. Compendium of Soybean Diseases and Pests. **Fifth Edition**. 2016.
- HOFFMANN, S. G. Fertilizantes foliares associados à fungicida no controle *in vitro* de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*. **Monografia (Agronomia)**. Universidade Federal do Mato Grosso. (2019).
- HU, L. et al. Copper nanoclusters as peroxidase mimetics and their applications to H₂O₂ and glucose detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 83-86, 2013.
- HUBER, D. M. et al. The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. **Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications**, p. 169-204, 1999.
- ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. 1º Encontro técnico sobre as culturas da soja e do milho no noroeste paulista. Nucleus, **Edição Especial**, 2013.
- JACKSON-ZIEMS, T. A. et al. **Understanding Fungicide Resistance**. 2017.
- JOULI, H.; EL FERJANI, E. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, n. 7, p. 639-644, 2003.

JULIATTI, F.C. et al. Sensitivity of two isolates of *Phakopsora pachyrhizi* to dithiocarmamate, chloronitril, triazoles, strobilurins, and carboxamides fungicides. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 4, 2017.

JÚNIOR, S. et al. Efeito direto de formulações de fosfitos a *Phoma tarda* e *Colletotrichum gloeosporioides*. 2012.

JÚNIOR, M.B.S. et al. qPCR-based detection of *Colletotrichum truncatum* in soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 5, p. 550-555, 2020.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

KENNY, M. K.; GALEA, V. J.; PRICE, T. V. Effect of fungicides in vitro and on detached berries on control of coffee berry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Plant Protection Quarterly**, v. 27, n. 2, p. 59-63, 2012.

KUMAR, C. J. N. et al. Influence of foliar fertilization of micronutrients on leaf micro nutrient status of mandarin orange in lower pulney hills. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v.5, n.5, p. 516-522, 2017.

LIN, C. C.; CHEN, L. M.; LIU, Z. H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 855-861, 2005.

LOON, L. C. van; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

LOON, L. C.; STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

MA, C. et al. Advanced material modulation of nutritional and phytohormone status alleviates damage from soybean sudden death syndrome. **Nature nanotechnology**, v. 15, n. 12, p. 1033-1042, 2020.

MACHADO, J. C.; **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MAJUMDAR, S. et al. Unraveling metabolic and proteomic features in soybean plants in response to copper hydroxide nanowires compared to a commercial fertilizer. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 20, p. 13477-13489, 2021.

JAHAGIRDAR, S. et al. Evaluation of different fungicides against *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of soybean. **Journal of Plant Disease Sciences**, v. 13, n. 1, p. 36-40, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes. **Brasília: Mapa/ACS**. 34p. 2009.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 113-116, 2003.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. Changes in the phenylalanine ammonia lyase activity, total phenolic compounds, and flavonoids in *Prosopis glandulosa* treated with cadmium and copper. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 1465-1472, 2018.

MORAL, J. et al. Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. **Crop Protection**, v. 114, p. 167-176, 2018.

NAIR, P. M. G.; CHUNG, M. A mechanistic study on the toxic effect of copper oxide nanoparticles in soybean (*Glycine max* L.) root development and lignification of root cells. **Biological trace element research**, v. 162, n. 1, p. 342-352, 2014.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, 2001

NAVARINI, L. et al. Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) na cultura da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 182-186, 2007.

NGUYEN, V.T.; DANG-THI, M.S.; TRINH, K.S. Antifungal Activity of Gelatin-Tapioca Starch Film and Coating Containing Copper Nanoparticles against *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose. **Journal of Chemistry**, v. 2020, 2020.

PARREIRA, D. F., NEVES, W. S., ZAMBOLIM, L. Resistance of Fungi to Fungicides Quinone Inhibitors. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 3, n. 2, p. 24, 2009.

PEREIRA, B. A. Fontes de cobre no controle da ferrugem do cafeeiro. **Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)** – Universidade Federal de Lavras - UFLA. 18-20p. Lavras, 2018.

PEREIRA, A.C. et al. Selection of anthracnose resistant common beans using detached leaves in partially controlled environment. **Revista Ceres**, v. 61, p. 518-522, 2014.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; ROSA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. E.; NETO, J.C. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2390-2395, 2009.

PICCINI, E. C. & FERNANDES, J. M. Doenças de Soja: diagnose, epidemiologia e controle. **Embrapa Passo Fundo**, 3ª edição, 2003.

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

PRICE, O. O. et al. Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii* a soybean pathogen. **Plant Disease**, v. 99, p. 1596-1603, 2015.

PRINTZ, B. et al. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 601, p. 16 p., 2016.

- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos. 2. ed. Santa Cruz do Sul: **Edunisc**. p. 491, 2002.
- RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.
- RIBEIRO, F. de C. et al. Fungicidal protective association with systemic fungicides in the target spot control in soybean. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 5, p. 51-56, 2016.
- REIS, E.M.; CARREGAL, L.H.; ZANATTA, M. Comparison of the efficacy of QoI fungicides, alone or in mixture with triazoles, in Asian soybean rust control, 2016/17 growing season. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 28-32, 2019.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, 2003.
- ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402-415, 2017.
- SARTORATO, A., YORINORI, J. T. Oídios e leguminosas: feijoeiro e soja. In: STADINIK, M. J., RIVERA, M. C. Oídios. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2001.
- SILVA JUNIOR, M.B. et al. Phosphites for the management of anthracnose in soybean pods. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 2, p. 611-617, 2021.
- SIKORA, E. J. et al. A coordinated effort to manage soybean rust in North America: A success story in soybean disease monitoring. **Plant disease**, v. 98, n. 7, p. 864-875, 2014.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- SOARES, R. M.; GODOY, C.V.; OLIVEIRA, M.C.N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 333-338, 2009.
- SOUZA FILHO, R. C.; Caracterização fisiológica e sensibilidade de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de feijão-vagem a fungicidas. **Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)** – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” – UNESP. 63p. Botucatu, 2013.
- SPADOTTO, C. A.; BETTIOL, W. Uso de fungicidas e potencial de contaminação ambiental no Brasil. Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE), 1997.
- SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E; Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, 1990.
- SNOW, J. P.; BERGGREN JÚNIOR, G. Target spot. **Compendium of soy bean diseases**, v. 3, p. 106, 1989.
- STANDISH, J. R. et al. Occurrence of QoI fungicide resistance in *Cercospora sojina* from Mississippi soybean. **Plant disease**, v. 99, n. 10, p. 1347-1352, 2015.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiología vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. et al. **Fisiología vegetal/Plant physiology**. Universitat Jaume I, 2013.
- THOMAS, A. L. **Soja: tipos de crescimento da planta**. 2018.
- TÖFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J. Ação protetora, residual, curativa e anti-esporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 209-221, 2012.
- TOIGO, S. et al. Chemical control of soybean powdery mildew. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.4, p. 491-496, 2008.
- TUPICH, F. L. B. et al. Impacto do controle do mofo-branco com fluazinam na produtividade da soja no Sul do Paraná: metanálise. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 145-150, 2017.
- TOQEER, I. et al. Synthesis and application of controlled size copper oxide nanoparticles for improving biochemical and growth parameters of maize seedling. **Journal of Plant Nutrition**, v. 43, n. 17, p. 2622-2632, 2020.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, n. 1, 1991.
- VELOSO, J. S. et al. Factors influencing biological traits and aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with cashew anthracnose in Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 1, p. 167-180, 2021.
- XAVIER, S. A. et al. Sensitivity of *Corynespora cassicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. **Tropical plant pathology**, v. 38, n. 5, p. 431-435, 2013.
- XAVIER, W. D. et al. Use of copper-based pesticides to control fungal diseases of soybean in Northern Brazil. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1-10, 2019.
- WEITZ, H. J. et al. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 2, p. 165-170, 2001.
- YANG, H. & HARTMAN, G. L. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**. V. 99, p. 143-148, 2015.
- ZENG, F. et al. Characterization of quinone outside inhibitor fungicide resistance in *Cercospora soja* and development of diagnostic tools for its identification. **Plant disease**, v. 99, n. 4, p. 544-550, 2015.
- ZHANG, G. et al. Widespread occurrence of quinone outside inhibitor fungicide-resistant isolates of *Cercospora soja*, causal agent of frog-eye leaf spot of soybean, in the United States. **Plant Health Progress**, v. 19, n. 4, p. 295-302, 2018.
- ZHANG, X.; LIU, C. J. Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. **Molecular Plant**, [s.l.], v. 8, p. 17-27, 2015.

ZHANG, G. R.; NEWMAN M. A.; BRADLEY, C. A. First Report of the Soybean Frogeye Leaf Spot Fungus (*Cercospora sojina*) Resistant to Quinone Outside Inhibitor Fungicides in North America. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 767-767, 2012.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resumo da análise de variância da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		PAL Antes	PAL Após
Tratamento	2	142805,15 ^{NS}	53554,43 ^{NS}
Bloco	3	1353357,49 ^{NS}	97973,67 ^{NS}
Tempo	3	2813840,32 ^{NS}	198832,09 ^{NS}
Tratamento x Tempo	6	3123340,47 [*]	33226,06 ^{NS}
Resíduo	47	-	-
Média	-	1100,44	614,10
CV _{exp.} (%)	-	100,25	57,56

^{NS} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{*} valor significativo ao nível de 5%, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental. PAL Antes - tempos de coleta após aplicação do produto; PAL Após - tempos de coleta após a inoculação do patógeno.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância da atividade da enzima peroxidase (POX) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		POX Antes	POX Após
Tratamento	2	1804,20 ^{NS}	10835,12 *
Bloco	3	4708,08 ^{NS}	489,07 ^{NS}
Tempo	3	11912,37 *	8964,51 ^{NS}
Tratamento x Tempo	6	3861,77 ^{NS}	1270,24 ^{NS}
Resíduo	47	-	-
Média	-	96,06	105,01
CV _{exp.} (%)	-	48,07	50,68

^{NS} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * valor significativo ao nível de 5%, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental. POX Antes - tempos de coleta após aplicação do produto; POX Após - tempos de coleta após a inoculação do patógeno.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE C - Resumo da análise de variância da atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		PPO Antes	PPO Após
Tratamento	2	1,75E+0009 ^{NS}	922056203,67 *
Bloco	3	2,29E+0009 ^{NS}	190567283,31 ^{NS}
Tempo	3	114634243,29 ^{NS}	66872238,59 ^{NS}
Tratamento x Tempo	6	4,85E+0009 *	526598030,61 ^{NS}
Resíduo	47	-	-
Média	-	49971,46	36356,32
CV _{exp.} (%)	-	71,68	44,02

^{NS} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * valor significativo ao nível de 5%, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental. PPO Antes - tempos de coleta após aplicação do produto; PPO Após - tempos de coleta após a inoculação do patógeno.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE D - Resumo da análise de variância de teores de compostos fenólicos solúveis totais em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Fenol Antes	Fenol Após
Tratamento	2	0,52 ^{NS}	5,51 ^{NS}
Bloco	3	0,42 ^{NS}	1,25 ^{NS}
Tempo	3	9,91 *	0,45 ^{NS}
Tratamento x Tempo	6	1,44 ^{NS}	4,38 ^{NS}
Resíduo	47	-	-
Média	-	4,98	4,93
CV _{exp.} (%)	-	21,06	35,64

^{NS} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * valor significativo ao nível de 5%, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental. Fenol Antes - tempos de coleta após aplicação do produto; Fenol Após - tempos de coleta após a inoculação do patógeno.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE E - Resumo da análise de variância de teores de lignina solúvel em folhas de soja pulverizadas com tetraaminoetanol de cobre nas doses de 2 e 3 mL L⁻¹.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Lignina Antes	Lignina Após
Tratamento	2	15,55 *	32,24 *
Bloco	3	5,89 ^{NS}	26,67 *
Tempo	3	18,49 *	0,0007 *
Tratamento x Tempo	6	8,93 *	0,75 ^{NS}
Resíduo	47	-	-
Média	-	7,95	9,52
CV _{exp.} (%)	-	24,15	26,61

^{NS} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * valor significativo ao nível de 5%, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental. Lignina Antes - tempos de coleta após aplicação do produto; Lignina Após - tempos de coleta após a inoculação do patógeno.

Fonte: Do autor (2022).