



DILSON LUCAS FERNANDES SILVA

**NUTRIENTES MINERAIS ATIVAM RESPOSTAS DE DEFESA
EM SOJA PARA O MANEJO DO OÍDIO**

**LAVRAS-MG
2024**

DILSON LUCAS FERNANDES SILVA

**NUTRIENTES MINERAIS ATIVAM RESPOSTAS DE DEFESA EM SOJA PARA O
MANEJO DO OÍDIO**

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 obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS-MG
2024**

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

Silva, Dilson Lucas Fernandes.

Nutrientes minerais ativam respostas de defesa em soja para o
manejo do oídio / Dilson Lucas Fernandes Silva. - 2024.

71 p.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. *Erysiphe diffusa*. 2. *Glycine max*. 3. indutor de resistência. I.
Resende, Mário Lúcio Vilela de. II. Título.

DILSON LUCAS FERNANDES SILVA

**NUTRIENTES MINERAIS ATIVAM RESPOSTAS DE DEFESA EM SOJA PARA O
MANEJO DO OÍDIO**

**Mineral nutrients activate defense responses in soybean for powdery mildew
management**

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.

APROVADO em 29 de fevereiro de 2024.

Dr. Edson Ampélio Pozza, UFLA. UFLA

Dr. Fábio Aurélio Dias Martins. EPAMIG

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS-MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e dar forças durante essa jornada.

À minha família, pelo constante apoio e carinho durante toda a minha trajetória.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Lúcio, pela orientação, paciência e confiança prestados durante essa trajetória.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial Deila, Tharyn, Thamires, Lorena, Mariana e Wilder.

Às amigas feitas no Departamento de Fitopatologia (DFP), de modo especial a Ariane e a Zenóbia por me auxiliarem sempre.

Agradeço imensamente à Dona Maria Clara Saraiva Biavati, ao seu Nilo Sergio Biavati e ao Enzo Biavati por me acolherem durante minha estadia em Lavras.

A todos os professores e técnicos do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelo compartilhamento do conhecimento.

Muito Obrigado!

“A ciência não é, e nunca será, um livro fechado.”

Einstein e a Bomba (documentário)

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, sendo uma das principais culturas agrícolas brasileira. Fatores bióticos, como a ocorrência de fungos são responsáveis por ocasionar grandes perdas na produção desta cultura. O fungo *Erysiphe diffusa*, agente etiológico do oídio da soja, são fungos biotróficos que podem provocar perdas na produtividade que variam de 10 a 35%. A principal medida de controle desta doença é a aplicação de fungicidas químicos, entretanto a utilização de elementos minerais como o cobre são uma alternativa para o controle dessa doença, uma vez que esse elemento possui características antifúngica e ação no sistema de defesa das plantas as quais promovem os mecanismos em resposta ao ataque dos patógenos. Neste contexto, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos da calda cúprica aplicada de modo isolado ou em associação com cálcio e/ou magnésio no manejo do oídio em soja e nas respostas de defesa das plantas. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, sendo conduzidos em delineamentos de blocos casualizados (DBC) com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por controle negativo (sem aplicação de produtos), controle positivo (fungicida comercial) e seis tratamentos constituídos por diferentes combinações de doses de cálcio, magnésio e cobre. Foram avaliadas a severidade do oídio com base em uma escala diagramática e o crescimento das plantas. As plantas que apresentaram menor severidade da doença foram analisadas quanto as suas respostas de defesa, sendo determinada a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), quantificados os teores de compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel, clorofila A e B, fitoalexina gliceolina, coumestrol, daidzeína, genisteína e gliciteína. Os resultados indicaram que a aplicação foliar de 1 kg/ha⁻¹ de sulfato cobre associado a 0,5 Kg/ha GEOX é uma alternativa promissora no manejo de oídio na cultura da soja. Também foi identificado que essa mesma dose pode atuar como eliciador do complexo de enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT) que catalisam as espécies reativas de oxigênio sem causar prejuízos no desenvolvimento das plantas de soja.

Palavras-chave: *Erysiphe diffusa*; *Glycine max*; controle de doença; indutor de resistência; respostas de defesa.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a legume belonging to the Fabaceae family and is one of the main agricultural crops in Brazil. Biotic factors, such as the occurrence of fungi, are responsible for causing significant losses in the production of this crop. The fungus *Erysiphe diffusa*, the etiological agent of soybean powdery mildew, is a biotrophic fungus that can lead to productivity losses ranging from 10 to 35%. The primary control measure for this disease is the application of chemical fungicides. However, the use of mineral elements such as copper is an alternative for controlling this disease, as this element possesses antifungal characteristics and acts in the plant defense system, promoting mechanisms in response to pathogen attacks. In this context, the objective of this study is to evaluate the effects of copper spray applied either alone or in combination with calcium and/or magnesium in managing powdery mildew in soybeans and in the defense responses of the plants. The experiments were conducted in a greenhouse at the Department of Phytopathology, Federal University of Lavras, following randomized block designs (DBC) with four replications. The treatments included a negative control (no application of products), a positive control (commercial fungicide), and six treatments consisting of different combinations of calcium, magnesium, and copper doses. Powdery mildew severity was evaluated based on a diagrammatic scale, as well as plant growth. Plants showing lower disease severity were analyzed for their defense responses, determining the activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD), quantifying the levels of total soluble phenolic compounds, soluble lignin, chlorophyll A and B, phytoalexin glyceollin, coumestrol, daidzein, genistein, and glycitein. The results indicated that foliar application of 1 kg/ha-1 copper sulfate associated with 0.5 kg/ha GEOX is a promising alternative in the management of soybean powdery mildew. It was also identified that this same dose can act as an elicitor of the complex of antioxidant enzymes (SOD, POD, and CAT) that catalyze reactive oxygen species without causing damage to the development of soybean plants.

Keywords: *Erysiphe diffusa*; *Glycine max*; disease control; inducer of resistance; defense responses.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, é a principal cultura do agronegócio brasileiro, desempenha um papel crucial na alimentação animal, sendo uma fonte rica em proteína, e amplamente utilizada na produção de óleo vegetal para o consumo humano. Fatores bióticos, como a ocorrência de fungos são responsáveis por ocasionar grandes perdas na produção desta cultura. O principal meio de controle desses fungos é através da utilização de produtos químicos dos quais encarece o custo de produção, havendo risco de contaminação ao meio ambiente. O fungo *Erysiphe diffusa*, agente etiológico do oídio da soja, são fungos biotróficos que podem provocar perdas na produtividade que variam de 10 a 35%. A utilização de elementos minerais como o cobre são uma alternativa para o controle dessa doença, uma vez que esse elemento possui características antifúngica e ação no sistema de defesa das plantas as quais promovem os mecanismos em resposta ao ataque dos patógenos. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da calda cúprica aplicada de modo isolado ou em associação com cálcio e/ou magnésio no manejo do oídio em soja e nas respostas de defesa das plantas. Os resultados desse indicaram que a aplicação foliar de 1 kg/ha⁻¹ de sulfato cobre associado a 0,5 Kg/ha GEOX é uma alternativa promissora no manejo de oídio na cultura da soja, promovendo a ativação das enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT) que catalisam as espécies reativas de oxigênio sem causar prejuízos no desenvolvimento das plantas de soja, resultado na menor dependência da utilização de produtos químicos reduzindo os custos de produção e os possíveis danos causados ao meio ambiente pelo uso de agrotóxicos.

Social, technological, economic and cultural impacts

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a legume belonging to the Fabaceae family, and it is the main crop in Brazilian agribusiness. It plays a crucial role in animal feed, being a rich source of protein, and widely used in the production of vegetable oil for human consumption. Biotic factors, such as the occurrence of fungi, are responsible for causing significant losses in the production of this crop. The primary means of controlling these fungi is through the use of chemical products, which increases production costs and poses a risk of environmental contamination. The fungus *Erysiphe diffusa*, the etiological agent of soybean powdery mildew, is a biotrophic fungus that can cause productivity losses ranging from 10 to 35%. The use of mineral elements such as copper is an alternative for controlling this disease since this element has antifungal characteristics and acts in the plant's defense system, promoting mechanisms in response to pathogen attacks. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of copper sulfate applied either alone or in association with calcium and/or magnesium in managing soybean powdery mildew and in the defense responses of the plants. The results indicated that foliar application of 1 kg/ha⁻¹ of copper sulfate associated with 0.5 kg/ha of GEOX is a promising alternative in managing powdery mildew in soybean cultivation. It promotes the activation of antioxidant enzymes (SOD, POD, and CAT) that catalyze reactive oxygen species without causing damage to soybean plant development, resulting in reduced dependence on chemical products, lowering production costs, and minimizing potential environmental damage caused by pesticide use.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ativação e ação de resistência sistêmica em plantas. A resistência sistêmica induzida e a resistência sistêmica adquirida são estimuladas por fatores externos variados que ativam cascatas que resultam em respostas de defesa da planta.	23
Figura 2: Rota parcial dos fenilpropanóides onde são mostrados intermediários e enzimas envolvidos na síntese de isoflavonas.	26
Figura 3: Altura de planta, diâmetro e número de nó em função dos diferentes tratamentos aplicados via foliar na soja para o manejo do oídio.	35
Figura 4: Peso fresco e seco da parte aérea da soja.	36
Figura 5: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.	37
Figura 6: Cromatograma da solução-padrão dos compostos clorofila A e B na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	38
Figura 7: Teores de clorofila total (clorofila A + B) em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.	39
Figura 8: Teores de carotenoides em função dos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.	40
Figura 9: Teores dos compostos fenólicos solúveis totais em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.	41
Figura 10: Teores de lignina total em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.	42
Figura 11: Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).	43
Figura 12: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).	44
Figura 13: Atividade da enzima peroxidase (POD) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).	45
Figura 14: Atividade da enzima catalase (CAT) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).	47
Figura 15: Cromatograma da amostra sem fortificação e com fortificação (seletividade).	48
Figura 16: Cromatograma da solução-padrão dos compostos daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol nas concentrações de 10, 5, 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.	49
Figura 17: Teores de daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol nas folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos utilizados em experimento conduzido em casa de vegetação para o manejo do oídio da soja.	27
Tabela 2: Dados de pH das caldas, antes da primeira e segunda aplicação.	28
Tabela 3: Diferentes combinações dos nutrientes cobre, cálcio e magnésio para análises enzimáticas.	29
Tabela 4: Coeficientes de correlação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), coeficiente de variação (CV), precisão e exatidão dos padrões Clorofila A e B.....	38
Tabela 5: Coeficientes de correlação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão dos padrões daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol.....	49

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Cultura da soja.....	17
3.2 Oídio.....	17
3.3 Nutrição mineral no manejo de doenças.....	18
3.4 Mecanismos de defesa das plantas contra os agentes fitopatogênicos.....	20
3.4.1 Barreiras físicas.....	20
3.4.2 Barreiras químicas.....	21
3.5 Indução de resistência a patógenos.....	22
3.6 Estresse oxidativo.....	23
3.7 Lignina.....	24
3.8 Isoflavonoides (Isoflavonas).....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Experimentos em casa de vegetação.....	27
4.2 Experimento 1: avaliação morfológica da planta e da severidade da doença.....	27
4.3 Experimento 2: análises bioquímicas.....	28
4.3.1 Preparo do extrato enzimático e determinação da atividade enzimática.....	29
4.3.2 Determinação de compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel e carotenoides.....	31
4.3.3 Quantificação de teores de clorofila A e B.....	32
4.3.4 Quantificação e caracterização de isoflavonóides.....	33
4.4 Análises estatísticas.....	35
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Experimento 1: avaliação morfológica da soja e severidade do oídio.....	35
5.2 Experimento 2: análises bioquímicas.....	37
5.2.1 Teor de Clorofila.....	37
5.2.2 Teores de carotenoides.....	39
5.2.3 Compostos fenólicos solúveis totais.....	40
5.2.4 Lignina solúvel.....	41
5.2.5 Fenilalanina amônia-liase (PAL).....	42
5.2.6 Superóxido dismutase (SOD).....	43
5.2.7 Peroxidase (POD).....	45

5.2.8 Catalase (CAT).....	46
5.2.9 Detecção e quantificação dos isoflavonoides	48
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal cultura do agronegócio brasileiro, sendo cultivada em todo o território nacional. Para safra 2023/2024 estão estimados um volume de produção de 149,4 milhões de toneladas (CONAB 2023). Essa ascensão se deve à diversidade de cultivares adaptadas a diferentes ambientes. Além disso, a definição de práticas de cultivo como uma boa fertilidade do solo, adubação equilibrada e estratégias de manejo possibilitaram uma área plantada maior em relação aos demais cultivos (MISSÃO, 2006; EMBRAPA, 2015; CONAB, 2021).

Apesar dos avanços, fatores bióticos, como fungos, ainda representam desafios para aumentar a produtividade da soja (FERNANDES et al., 2009; EMBRAPA, 2013; WANG et al., 2021). Os oídios são um dos mais importantes grupos de fungos patogênicos de plantas (BEDENDO, 2011; REIS et al., 2021). Na cultura da soja, o patógeno causador da doença é o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* (STADNIK, 2001), que possui a capacidade de infectar toda a parte aérea da planta. Os conídios do patógeno germinam e penetram nas células da epiderme, resultando em uma camada de micélio esbranquiçada e pulverulenta (STADNIK; RIVERA, 2001; YULIA et al., 2017). Os sintomas podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo o aparecimento dos sintomas nas folhas a sua ocorrência mais comum (SILVA et al., 2013; YULIA et al., 2017). As perdas de produtividade causadas por essa doença podem variar de 10 a 35% (HARTMAN, 2015).

Para impedir a infecção em seus tecidos ou amenizar os danos causados por patógenos, as plantas desencadeiam uma diversidade de mecanismos de resistência. A primeira linha de defesa são as barreiras físicas, como cutícula, ceras e tricomas, seguida por metabólitos secundários ou especializados. Estes metabólitos atuam como barreiras químicas na defesa das plantas, sendo os compostos fenólicos um dos mais importantes (AMORIM, 2020; WANG et al., 2021 e DE OLIVEIRA, 2023). Além disso, alguns desses compostos estão envolvidos em mecanismos específicos, como a resposta de hipersensibilidade (HR), a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), a resistência sistêmica adquirida (SAR), e outros sinalizadores como ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (FERNANDES, et al., 2009; AMORIM, 2020; DE OLIVEIRA, 2023).

Quando a planta é submetida a um estresse ocorre o acúmulo de compostos fenólicos, os quais ativam mecanismos de defesa sistêmica para proteger os tecidos saudáveis (NUNES, et al., 2018). A ativação desses mecanismos pode ocorrer devido a presença de um patógeno ou de

um elicitor de origem não patogênica. A utilização de agentes externos que promovem estresses, por exemplo, estimulam a expressão de genes de defesa, desencadeando a resistência nas plantas, o que é conhecido como resistência induzida (PASCHOLATI; LEITE, 1995; STADNIK, 2000). Desta forma, essa resistência desempenha o papel de atrasar ou impedir a penetração de microrganismos, além de criar condições desfavoráveis para a colonização dos tecidos da planta (SOARES; MACHADO, 2007; PIETERSE et al., 2012, WALTERS et al., 2013, e PIETERSE et al., 2014). Os compostos fenólicos induzem a atividade de diversas enzimas-chave de defesa, como a fenilalanina amônia-liase (PAL) (STANGARLIN et al., 2011). Esta enzima catalisa a primeira reação da via dos fenilpropanóides, sintetizando diversos compostos fenólicos, como lignina e flavonoides (RESENDE et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012; ARDILA et al., 2013; LORENZETTI et al., 2018; APPU et al., 2021).

No entanto, o acúmulo desses compostos pode ser tóxico para as plantas, desencadeando estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ERO). Quando as EROs são produzidas em quantidades elevadas, podem levar à morte celular, também conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR) (MITTLER 2017). A HR é essencial para a resposta de defesa, especialmente de patógenos biotróficos. Entretanto, quando ocorre de forma descontrolada esta morte celular gera uma necrose. Por isso, para desintoxicação, a planta dispõe de enzimas antioxidantes, que reduzem ou inibem a oxidação, tais como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT), fato que torna esse mecanismo eficiente (SWANSON; GILROY, 2010).

Uma das alternativas no controle de doenças em plantas é a nutrição equilibrada por meio utilização de elementos minerais com atividade antifúngica e ação no sistema de defesa vegetal, como os elementos cálcio, cobre e magnésio (HUBER & HANEKLAUS, 2007 e POZZA & POZZA, 2023). Esses elementos desempenham papéis cruciais em rotas metabólicas e na produção de compostos capazes de inibir a infecção e colonização por patógenos. O cálcio possui funcionalidade de fortalecer a parede celular (pectato de cálcio) e conseqüentemente, dificultar a ação de enzimas pectolíticas oriundas de patógenos (EPSTEIN & BLOOM, 2004; STAEL et al., 2012). O cobre, por sua vez, está relacionado a diversas funções nos processos fisiológicos, tais como, respiração e fotossíntese, também atua como cofator de enzimas relacionada à indução de resistência sistêmica através da síntese de lignina, fenóis e quinonas (MARSCHNER, 1995, MALAVOLTA, 2006, CUNHA; MENDES; CHALFOUN, 2012; BRINATE et al., 2015). O magnésio está relacionado com os processos metabólicos envolvendo a participação estrutural na formação da clorofila, fotossíntese e cofator da maioria

das enzimas fosforilativas, que formam uma ponte entre o ATP e o ADP (MALAVOLTA et al., 1997 e NACHTIGALL, 2007).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da calda cúprica aplicada em associação com cálcio e/ou magnésio para ativar o sistema de defesa da soja contra o oídio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da calda cúprica aplicada em associação com cálcio e/ou magnésio para ativação do sistema de defesa da soja contra o oídio.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar os efeitos da aplicação de cobre associado com os nutrientes cálcio e/ou magnésio na severidade do oídio em soja em casa de vegetação;
- ii. Comparar o (s) tratamento (s) com maior controle da doença com produto comercial na severidade do oídio em casa de vegetação;
- iii. Determinar a atividade das enzimas PAL, POD, SOD e CAT em folhas de soja coletadas em diferentes tempos após aplicar o (s) tratamento(s) selecionado(s);
- iv. Quantificar os teores de coumestrol, daidzeína, genisteína e gliciteína, compostos fenólicos solúveis totais, carotenoides, lignina solúvel e clorofila A e B em folhas de soja coletadas após aplicar o(s) tratamento(s) que apresentou (aram) maior controle da doença.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa originária do continente asiático, pertencente à família Fabaceae, sendo uma planta herbácea com estatura que pode variar entre 60 a 110 cm de altura, com ciclo de vida entre 70 e 200 dias, dependendo das condições do ambiente e da variedade cultivada. Essa cultura desempenha um papel crucial na alimentação animal, sendo uma fonte rica em proteína, e amplamente utilizada na produção de óleo vegetal para o consumo humano (ZHAO et al., 2017; EMBRAPA, 2021 e ISLAM et al., 2022). O cultivo de soja comercial no Brasil ocorreu, pela primeira vez, em 1914, na cidade de Santa Rosa - Rio Grande do Sul e desde então, conquistou espaço significativo no setor agrícola brasileiro. Ao final da década de 40, o Brasil já ganhava destaque como produtor no mercado internacional (HASSEN, 1996 e MARTINELLI, et al., 2017).

A partir da década de 70, a soja tornou-se a principal cultura do agronegócio brasileiro. Atualmente, é cultivada em todo o território nacional devido as diversas cultivares que se adaptaram aos diferentes ambientes, o que possibilitou maior área plantada em relação aos demais cultivos (MISSÃO, 2006; EMBRAPA, 2015; CONAB, 2021). Para a safra de 2023/2024 foi estimado crescimento de 2,3% de área plantada, resultando em um volume de 149,4 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2023).

Uma das principais limitações da produtividade da soja é a presença de diversos patógenos, entre eles: fungos, bactérias, nematoides e vírus. Em determinadas situações, esses agentes biológicos podem ocasionar perdas significativas, de até 100% da produção (EMBRAPA, 2013). Dentro desse grupo de agentes bióticos, destaca-se o oídio, que pode causar 35% de perdas (HARTMAN, 2015).

3.2 Oídio

Os oídios representam um dos grupos mais significativos de fungos patogênicos que afetam as plantas. Na cultura da soja, o agente causador dessa doença é o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa*, classificado no grupo de fungos Ascomicetos, pertencente à ordem Erysiphales e a família Erysiphaceae. São fungos biotróficos, altamente evoluídos e especializados, exibem uma estreita gama de hospedeiros (STADNIK, 2001). O primeiro registro dessa doença foi no ano de 1921 na Alemanha (SARTORATO; YORINORI, 2001). No Brasil, a identificação inicial ocorreu em casa de vegetação e posteriormente em campo, conforme constatada por Lehman (1945).

A incidência do oídio se manifesta de maneira mais acentuada nas regiões Sul e nas áreas elevadas dos Cerrados. As perdas de produtividade causadas por essa doença podem variar de 10 a 35% (HARTMAN, 2015). Os sintomas podem ocorrer em qualquer parte da planta, com os conídios do fungo germinando e infectando as células da epiderme, resultando em uma fina camada de micélio esbranquiçada e pulverulenta (STADNIK; RIVERA, 2001; YULIA et al., 2017).

Os fatores favoráveis para o progresso da doença incluem períodos de baixa umidade e temperaturas amenas (18 a 24 °C), sendo o período de 7 a 10 dias necessário para completar o seu ciclo de vida e iniciar o processo infeccioso nas plantas. A colonização ocorre por meio da inserção dos haustórios nas células da epiderme e a disseminação ocorre por vento (HENNING et al., 2014; HARTMAN, 2015). As estratégias de controle incluem a utilização de cultivares resistentes à doença, como a BRSMG 534 e BRS 2562XTD, uso de fungicidas e nutrição mineral equilibrada (SEIXAS et al., 2020; GODOY, 2022 e EMBRAPA, 2023).

3.3 Nutrição mineral no manejo de doenças

As defesas das plantas estão intrinsecamente relacionadas a uma nutrição equilibrada. Os nutrientes desempenham papéis cruciais em rotas metabólicas e na produção de compostos capazes de inibir a infecção e a colonização por patógenos, constituindo a principal linha de defesa contra doenças. Além disso, se caracteriza como componente integral da agricultura, promovendo melhorias no desempenho e nos rendimentos de produção das plantas (HUBER & HANEKLAUS, 2007; POZZA e POZZA, 2023).

Além dos nutrientes minerais absorvidos predominantemente do solo, elementos provenientes de aplicações foliares principalmente os micronutrientes, são necessários para garantir o desenvolvimento e crescimento adequados. As funções bioquímicas e as propriedades metabólicas desses elementos têm associação com vários aspectos da planta incluindo fisiologia, biologia molecular e bioquímica vegetal (YRUELA, 2009).

O cálcio (Ca^{2+}) desempenha diversas funções na planta, como estrutural, regulação de enzimas e mensageiro secundário por meio de sinalizações sistêmicas (TAIZ; ZIEGER, 1991, LUAN E WANG, 2021). Como mensageiro secundário, o cálcio recebe estímulos externos (luz, gravidade e estímulos mecânicos) e internos (hormônios), atuando nos mecanismos de transporte desse nutriente dentro da célula. Adicionalmente, esse elemento é essencial para a integridade e a estabilidade da membrana celular (MALAVOLTA, 2006; PIRAYESH et al. 2021).

O cálcio é pouco móvel na planta apresentando mobilidade limitada no floema. Isso evita o acúmulo excessivo desse nutriente nos órgãos. Entretanto, baixas concentrações de cálcio em frutos carnosos e tubérculos podem resultar no aumento da senescência do tecido, além de infecções fúngicas (MARSCHNER, 2012). Por isso, estabelecer de fluxos específicos de cálcio, controlados pelas plantas, é fundamental, pois desencadeia resposta no sistema de defesa. Para a resposta de defesa à patógenos, o influxo de cálcio intracelular ativa diversas proteínas sinalizadoras, tais como as CPKs (Calcium-dependent protein kinases) envolvidas na resposta imune ou na interação com a calmodulina (YUAN et al., 2017; LENZONI et al., 2018; TIAN et al., 2020b).

O magnésio (Mg^{2+}) é absorvido e transportado no xilema na forma de íon magnésio. Este elemento atua como ativador enzimático, em muitos casos, o Mg atua como cofator de enzimas fosforilativas, formando uma ponte entre o pirofosfato do ATP ou ADP e a molécula da enzima ATPase (FAQUIN, 2005). Essa transferência de energia é essencial em processos como fotossíntese (fase luminosa e fase escura), respiração (glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos), reações de compostos orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas), absorção iônica e expansão da raiz e aprofundamento (CASTRO, 2020).

No contexto de doenças, a deficiência de magnésio resulta no enfraquecimento da planta, já que leva ao acúmulo de substratos favoráveis ao patógeno, como aminoácidos e açúcares, devido à redução na síntese de proteínas (MALAVOLTA, 2006). O fornecimento adequado desse nutriente é crucial para a soja, devido acumular cerca de 40% de proteína em seus grãos (PIPOLO et al., 2015). O magnésio é o átomo central da molécula de clorofila, representando aproximadamente 2,7% do peso molecular deste pigmento (MARSCHNER, 2012). A maior concentração de Mg^{2+} está nas folhas, associado à pectina das paredes celulares, o que corresponde aproximadamente a 5-10% do magnésio total. Além disso, 75% do magnésio foliar está envolvido na síntese proteica (WHITE; BROADLEY, 2009).

O cobre (Cu) é um micronutriente cuja absorção acontece em forma iônica Cu^{2+} e Cu-quelato, com baixa mobilidade na planta. Esse elemento desempenha uma gama de funções vitais, incluindo a formação da clorofila, a participação na fotossíntese, nas cadeias respiratórias de transporte de elétrons, na proteção contra o estresse oxidativo e, no metabolismo de proteínas e carboidratos (FAQUIN, 2005; REHMAN et al., 2019). O cobre exerce ainda influência direta no metabolismo da parede celular, fosforilação oxidativa e eliciador para ativar respostas de defesa, incluindo a regulação da síntese do ácido abscísico (ABA), um fitohormônio envolvido

na abertura estomática, mobilização de ferro e biogênese do cofator de molibdênio (LIU et al., 2020).

O cobre é essencial em diferentes locais dentro da célula o citosol, o retículo endoplasmático a mitocôndria (membrana interna), estroma do cloroplasto, lúmen dos tilacóides e apoplasto (MARSCHNER 1995). Para evitar a toxicidade por cobre, as plantas desenvolveram mecanismos de tolerância para impedir o acúmulo de concentrações tóxicas na célula, evitando assim os efeitos prejudiciais às proteínas (YRUELA, 2009).

Esse elemento é responsável por desempenhar papéis importantes no manejo de doenças. Foi utilizado pela primeira vez na agricultura no século XVIII no controle do míldio da videira, na França (LAMICHHANE et al., 2018). Atualmente, é essencial na agricultura orgânica, onde o manejo de doenças depende quase unicamente de seu uso (HUBER & HANEKLAUS, 2007; De RESENDE, et al 2021).

3.4 Mecanismos de defesa das plantas contra os agentes fitopatogênicos

As plantas desencadeiam uma diversidade de mecanismos em resposta ao ataque dos patógenos. Na superfície vegetal, barreiras físicas pré-formada como a cutícula, ceras e tricomas se caracterizam como a primeira linha de defesa das plantas (WANG et al. 2021). Após a ruptura dessa primeira barreira, as plantas possuem uma segunda linha de defesa proveniente dos metabólitos secundários (ou especializados), que desempenham importantes papéis, atuando como barreiras químicas na defesa e adaptação das plantas.

Um dos mais importantes metabólitos secundários são os compostos fenólicos, que constituem um grupo quimicamente heterogêneo: apresentam o grupo fenol com hidroxila funcional em um anel aromático. Certos compostos desse grupo como taninos, antocianinas, lignina, isoflavonas, flavonas e flavonoides desempenham um papel crucial na prevenção de herbívora e patógenos nas plantas (AMORIM, 2020; DE OLIVEIRA, 2023). Além disso, alguns desses compostos estão envolvidos em mecanismos específicos, como a resposta de hipersensibilidade (HR), a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), a resistência sistêmica adquirida (SAR) e outros sinalizadores como ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (FERNANDES, et al., 2009; AMORIM, 2020; DE OLIVEIRA, 2023).

3.4.1 Barreiras físicas

As primeiras barreiras a serem rompidas por patógenos são as barreiras físicas encontradas na superfície das plantas. Essas estruturas incluem a forma, tamanho e a localização

dos estômatos, a deposição de cera e cutícula que cobrem a epiderme das folhas, que impedem ou dificultam o avanço do patógeno (DURBIN, 1988).

As ceras presentes nas superfícies de folhas e dos frutos formam uma camada hidrofóbica, prevenindo o acúmulo de água, no qual os patógenos podem se fixar e germinar (TEIXEIRA, 2011). Nesse sentido, as plantas se defendem da infecção por pequenas modificações em sua estrutura física, tais como o aumento de síntese de compostos que enrijece a membrana. Isso faz com que o aumento da espessura resulte na maior resistência à infecção por patógenos, que entram no hospedeiro apenas através de penetração direta (STANGARLIN et al., 2011).

3.4.2 Barreiras químicas

Quando o patógeno consegue superar as barreiras físicas, a planta ativa uma segunda barreira de defesa baseada em reações químicas. Essas reações envolvem duas linhas de defesa. A primeira consiste no reconhecimento dos padrões moleculares (PRR – *Pattern Recognition Receptors*), os quais estão localizados na membrana plasmática e realizam a identificação dos padrões moleculares associados a micróbios/patógenos ou algum dano (MAMPs/PAMPs – *Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns* e DAMPs – *Damage-Associated Molecular Patterns*, respectivamente). O reconhecimento dos MAMPs ocorre pela própria presença do microrganismo no ambiente celular, como o reconhecimento da quitina de um fungo ou outras estruturas como peptidoglicanos (PGN), lipopolissacarídeos (LPS) e β -glucanas de oomicetos. No caso dos DAMPs podem ser consequências da digestão de barreiras físicas, como a digestão da parede celular, liberando oligogalacturonídeos (OGA) ou da cutícula liberando monômeros de cutina (BOLLER & FELIX, 2009. TEIXEIRA, 2011 e HOU et al., 2019).

Na segunda linha de defesa da planta, a resposta ocorre via intracelular a partir do reconhecimento dos efetores específicos dos patógenos, sendo denominada de imunidade desencadeada por efetores (ETI - *effector-triggered immunity*). Essa resposta ocorre devido à presença de receptores intracelulares que apresentam um domínio de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NLR), designados proteínas de resistência (R), responsáveis pelo reconhecimento de proteínas efetoras dos patógenos. Assim como PTI, a ETI também apresenta características como o influxo de cálcio, alteração da transcrição gênica e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (liberação do radical superóxido - O_2^-). Diferentemente de PTI, a ETI tem como diferencial a resposta de hipersensibilidade (HR), que se caracteriza como uma morte celular no local de penetração do patógeno (DURRANT e DONG, 2004; ZHANG et al.,

2017). Além disso, a reação de HR pode desencadear uma resposta sistêmica e auxiliar na redução de novas infecções em tecidos distantes (VENEGAS-MOLINA et al., 2020).

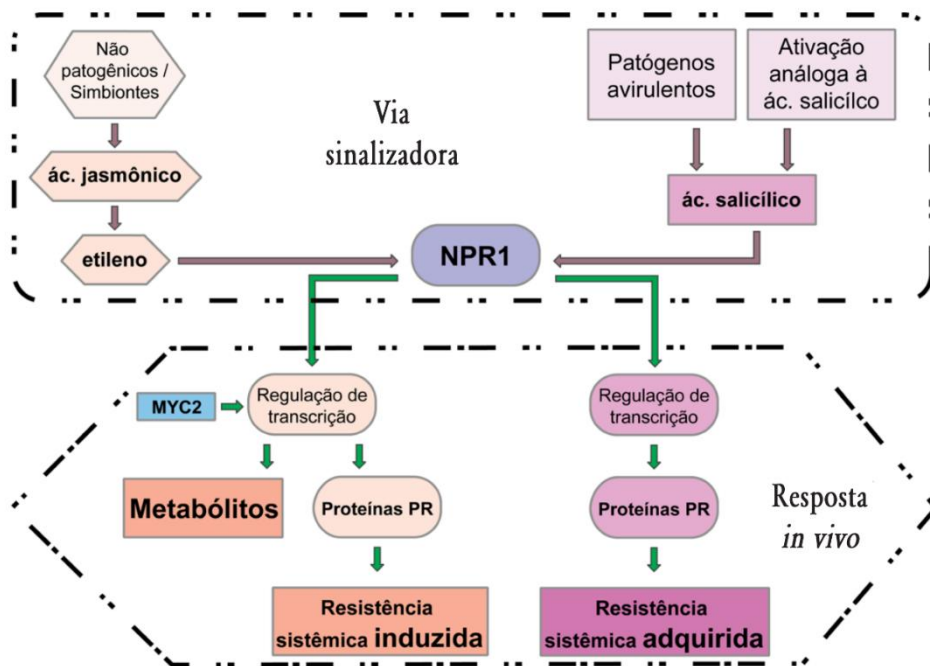
3.5 Indução de resistência a patógenos

A indução de resistência vegetal envolve a ação de agentes externos bióticos ou abióticos, os quais promovem estresses que podem estimular a expressão genes de defesa, desencadeando na resistência nas plantas, processo esse conhecido como resistência induzida (Figura 1). Desta forma, essa resistência desempenha o papel de atrasar ou impedir a penetração de microrganismos, além de criar condições desfavoráveis para a colonização dos tecidos da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995; STADNIK, 2000; SOARES; MACHADO, 2007; PIETERSE et al., 2012, WALTERS et al., 2013, PIETERSE et al., 2014).

A ativação das respostas de defesa envolve a regulação de hormônios vegetais, tais como como etileno (ET), ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), o que varia de acordo com o microrganismo invasor e dos efetores envolvidos (LATA et al., 2015; BASHIR et al., 2016; NUNES, 2018). Outro exemplo são as fitoalexinas, produzidas em resposta a estímulos naturais do início da infecção ou por indutores de resistência. Esses compostos fenólicos acumulam-se nos tecidos doentes, impedindo a colonização dos fitopatógenos (AGRIOS, 2005; SOLINO et al., 2017; FURLAN et al., 2020;).

Quando a planta é submetida a um estresse, ocorre o acúmulo de compostos fenólicos, que ativam mecanismos de defesa sistêmica para proteger tecidos saudáveis (NUNES, et al., 2018). Esses compostos induzem a atividade de diversas enzimas-chave de defesa, como a fenilalanina amônia-liase (PAL), uma enzima precursora na síntese da rota dos fenilpropanóides envolvidos na defesa vegetal (STANGARLIN et al., 2011). Essa enzima catalisa a primeira reação da via dos fenilpropanóides, sintetizando diversos compostos fenólicos, como lignina e flavonóides (RESENDE et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012; ARDILA et al., 2013; LORENZETTI et al., 2018).

Figura 1: Mecanismo de ativação e ação de resistência sistêmica em plantas. A resistência sistêmica induzida e a resistência sistêmica adquirida são estimuladas por fatores externos variados que ativam cascatas que resultam em respostas de defesa da planta.



Legenda. MYC2: fator de transcrição, NPR1: *Non-expressor of Pathogenesis-Related genes 1*, ác: ácido, Proteínas PR: Proteínas relacionadas a patogênese.

Fonte: Meyer et al., 2019.

No entanto, o acúmulo desses compostos podem ser tóxicos para as plantas, desencadeando estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ERO). De acordo com Mittler (2017), quando as EROs são produzidas em quantidades elevadas, pode ocorrer a morte celular devido à peroxidação dos lipídeos na membrana, oxidação das proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA e RNA. Para desintoxicação, a planta dispõe de enzimas antioxidantes, que reduzem ou inibem a oxidação, tais como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) (SWANSON; GILROY, 2010).

3.6 Estresse oxidativo

As enzimas antioxidantes são importantes para controlar as espécies reativas de oxigênio, apresentando variações nas concentrações entre diferentes plantas. Classificadas de acordo com os componentes metálicos em seus sítios, essas enzimas estão distribuídas nos cloroplastos, citoplasma e mitocôndrias (DAS e ROYCHOUDHURY, 2014; WANG et al., 2016). Este grupo de enzimas antioxidantes é composto principalmente pela SOD, POD e CAT, que possuem

como principal função catalisar a formação do H_2O_2 a partir do O^{2-} (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 1993; DUBEY, 2011; ANJUM et al., 2016; CHUNG, 2017).

A peroxidase (POD) é uma enzima-chave nos mecanismos bioquímicos de defesa das plantas, classificada como uma proteína relacionada à patogênese a PR-9 (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Essa enzima desempenha papel na indução de respostas de defesa e redução do estresse oxidativo. A POD é uma enzima oxirredutora envolvida na oxidação de fenóis, suberização, auxinas, metabólitos, síntese de fitoalexinas, reticulação dos componentes da parede celular e lignificação da célula vegetal durante as reações de defesa contra patógenos (SARAVANAN et al., 2004, DELAUNOIS et al., 2014, MANIKANDAN et al., 2021). A POD representa a última enzima na via biossintética da lignina. Essa glicoproteína exerce uma "dupla função", gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e utilizando-o como substrato (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN E PASCHOLATI; STANGARLIN ET AL. 2022).

A superóxido dismutase (SOD) é responsável por catalisar a dismutação de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (O^{2-} em H_2O_2), sendo a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (BOWLER et al., 1992, TOVMASYAN et al. 2015). Existem três tipos identificados de SOD, classificados por seus cofatores metálicos: cobre/zinco (Cu/ZnSOD), manganês (MnSOD) e ferro (FeSOD), localizados tanto no cloroplasto, mitocôndrias quanto no citosol (BOWLER et al., 1992; BABITHA et al., 2002). A SOD encontra-se principalmente nos estágios iniciais das EROs, na forma de oxigênio singlete e radicais livres, os quais são eliminados sequencialmente com a ajuda de GPx e CAT (STEPHENIE et al., 2020).

A catalase (CAT) é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio em água dentro das organelas celulares, como mitocôndrias e peroxissomos (CHELIKANI et.al 2004, KRISHNAMURTHY & WADHWANI, 2012, BATÍNÍC-HABERLE et al. 2015).

3.7 Lignina

A lignina é um polímero aromático complexo, presente nas paredes celulares das plantas, responsável por fornecer maior rigidez estrutural, durabilidade dos tecidos e transporte de água nos vasos do xilema. Também, atua como uma barreira a ação patogênica, é responsável pela inibição do crescimento e pela complexação dos carboidratos e proteínas. A lignina um metabólito secundário originado da via dos fenilpropanóides a partir do ácido chiquímico fenilalanina. Esse polímero é sintetizado a partir de três álcoois hidroxicinamoil: p-cumarílico,

coniferílico e sinapílico (BOUDET, 2000; BOERJAN et al., 2003; RASTOGI e DWIVEDI, 2008; BEZERRA, 2020).

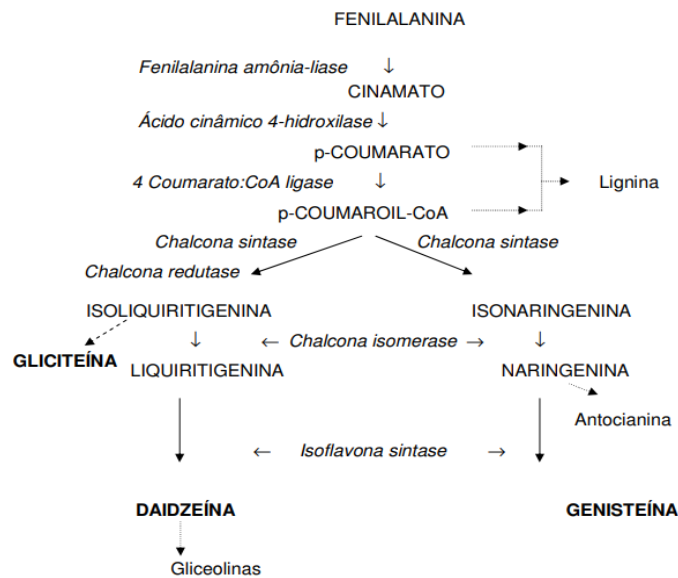
A deposição predominante da lignina ocorre na parede secundária de tecidos envolvidos na condução e suporte. Pressões provenientes de fatores bióticos e abióticos desencadeiam o aumento da lignificação da parede celular ou a alteração de sua estrutura por meio de ações enzimáticas (BEZERRA, 2020). Estudos conduzidos por Huth et al. (2016) corroboram sobre as atividades das enzimas antioxidantes em sementes de soja com diferentes teores de lignina submetidas à deterioração por umidade. Os resultados indicaram que cultivares com maiores teores de lignina apresentaram menor estresse oxidativo.

3.8 Isoflavonoides (Isoflavonas)

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos por plantas, caracterizados por várias hidroxilas ligadas a um anel aromático em sua estrutura geral. Com cerca de 5.000 estruturas conhecidas, esses compostos se subdividem em oito subclasses, como flavonóis, flavandiois, flavanonas, di-hidroflavanois, flavonas, flavonois, antocianidinas e isoflavonoides, sendo a última subclasse composta por cerca de 1.000 estruturas distintas (DEWICK, 2009; SHARMA 2013).

As isoflavonas (Figura 2), predominantemente encontradas como β -glicosídeos, acetyl- β -glicosídeos e malonil- β -glicosídeos, são solúveis em água. Modificações estruturais mínimas têm impacto significativo em suas propriedades biológicas e bioquímicas. As isoflavonas dietéticas podem ser categorizadas em agliconas, glicosídeos, acetyl-glicosídeos e malonilglicosídeos, cada categoria representando diferentes formas, como daidzeína, genisteína, glicitina e outras (MARIANA, 2007; DEWICK, 2009).

Figura 2: Rota parcial dos fenilpropanóides onde são mostrados intermediários e enzimas envolvidos na síntese de isoflavonas.



Fonte: Yu et al., 2003.

Os flavonoides, em sua maioria, são reconhecidos como agentes antifúngicos em plantas. Na soja, a produção de metabólitos secundários, como daidzeína, genisteína e coumestrol, apresentam sua maior concentração nos estádios reprodutivos (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; KIM et al., 2007 e SONG et al., 2014). Em um estudo conduzido por Aisyah et al. (2013) foi avaliada a composição dos isoflavonóides em plântulas de soja e verificou-se um aumento desses isoflavonoides quando utilizado um agente (*Rhizopus oryzae*) para atuar como um elicitador. Diante desse contexto, a compreensão desses compostos químicos torna-se importante, pois as isoflavonas são acumuladas nas folhas em resposta ao ataque de patógenos e atuam nas respostas de defesa (BARZ, 1992; NAKATA et al., 2016; VEREMEICHIK et al., 2019).

Compreender esses mecanismos envolvidos nas defesas das plantas, bem como a atuação dos elementos minerais cálcio, magnésio e cobre, pode contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas que promovam a proteção das plantas contra agentes patogênicos com menor dependência de agroquímicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimentos em casa de vegetação

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, situada no Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) com oito tratamentos e quatro repetições, sendo cada parcela experimental constituída por quatro plantas. A cultivar utilizada foi a M6410 IPRO (Monsoy), semeada em vasos de 25 litros contendo terra, areia e substrato comercial (PlantMax®) na proporção 2:1:1.

No primeiro experimento foram avaliados a morfologia da planta e a severidade do oídio da soja. Esse experimento está detalhado no item 4.2. Os tratamentos que apresentaram maior controle da doença foram utilizados no segundo experimento, que teve como objetivo realizar análises bioquímicas. O segundo experimento está detalhado no item 4.3.

4.2 Experimento 1: avaliação morfológica da planta e da severidade da doença

Neste experimento, os tratamentos foram constituídos por um controle negativo (sem aplicação de produtos), um controle positivo com aplicação de fungicida comercial Orkestra® (piraclostrobina e fluxapiroxade, na dosagem de 350 mL produto comercial por hectare (p.c./ha) e o volume de calda de 100 l/ha) e seis associações de sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - \text{Cu}$) com óxido de magnésio (MgO), GEOX Ultra® (CaO 32% + MgO 14%), sacarose e ferro (Fe^{+3}) nas proporções de 4:1 e 2:1, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos utilizados em experimento conduzido em casa de vegetação para o manejo do oídio da soja.

Tratamentos	Doses	Codificação
Controle negativo	-----	-----
Controle positivo	350ml p.c/ha ⁻¹	-----
S. de cobre + O. de magnésio	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	2Cu+1MgO
S. de cobre + GEOX®	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	2Cu+1GEOX
S. de cobre + O. de magnésio + Ferro	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹ + 0,04 kg/ha ⁻¹	2Cu+1MgO+Fe
S. de cobre + O. de magnésio + Sacarose	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	2Cu+1MgO+Sacarose
S. de cobre + O. de magnésio	2 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	4Cu+1MgO
S. de cobre + GEOX®	2 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	4Cu+1GEOX

Legenda: S. = sulfato; O. = óxido; p.c = Produto comercial.

Tabela 2: Dados de pH das caldas, antes da primeira e segunda aplicação.

Tratamentos	Controle negativo	2Cu+1MgO	2Cu+1GEOX®	2Cu+1MgO+Fe	2Cu+1MgO+ Sacarose	4Cu+1MgO	4Cu+1GEOX
1ª aplicação	-	8,6	7,4	9,5	8,2	5,8	5,6
2ª aplicação	-	8,7	7,4	9,6	8,2	5,9	5,5

Legenda: Cu. = Cobre; O. = óxido; Mg. = Magnésio; Fe. = Ferro.

Fonte: Do autor (2024)

Os tratamentos foram aplicados nos estádios V4 (dois trifólios completamente desenvolvidos) e R1 (Início do florescimento), totalizando duas aplicações durante o período experimental, com a presença de oídio nas plantas desde o primeiro estágio de aplicação.

Foram mensurados a altura das plantas (cm), diâmetro do caule (cm) e número de nós primários no primeiro dia após aplicação e 30 dias após a última aplicação. No final do experimento (estádio R.6), a parte aérea das plantas foram coletadas e armazenadas em sacos de papel. As amostras permaneceram em estufa com circulação forçada de ar a 60°C até atingirem peso constante para determinar o peso da parte aérea fresca (g) e seca (g), em balança de precisão.

A severidade do oídio foi avaliada com base na escala diagramática de Polizel e Juliatti (2010). A partir do surgimento dos primeiros sintomas da doença foram realizadas sete avaliações com intervalos de 3-4 dias. Os dados de severidade da doença foram convertidos em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de acordo com a equação de Shaner e Finney (1977).

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

Em que: AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; n: número total de avaliações; y_i : proporção da doença na i-ésima observação e t_i = tempo em dias na i-ésima observação.

4.3 Experimento 2: análises bioquímicas

Os tratamentos do experimento 1 (item 4.2) que obtiveram maior controle da doença e ausência de fitotoxicidade foram selecionados (Tabela 2) para análises das enzimas (fenilalanina amônia-liase - PAL, superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e peroxidase - POD), isoflavonoides (daidzeína, gliceteína, genisteína e coumestrol), compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel, carotenoides e clorofila A e B.

Para a análise da atividade enzimática foram coletadas o 3º trifólio desenvolvido nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação do produto (haap) que foram realizados no estágio V4 da planta. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente, armazenadas em ultrafreezer a -80°C para análises bioquímicas realizadas por espectrofotometria.

Para determinar os teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina foram utilizadas folhas correspondentes ao 3º trifólio desenvolvido, coletadas dez dias após a inoculação do patógeno. As folhas foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente em ultra freezer (-80°C) até o momento da liofilização.

Para a análise dos teores de clorofila A e B, carotenoides e isoflavonoides foram coletados o 3º trifólio desenvolvido 10 dias após a aplicação do produto. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente, em ultra freezer (-80°C) até o momento das análises cromatográficas.

Tabela 3: Diferentes combinações dos nutrientes cobre, cálcio e magnésio para análises enzimáticas.

Tratamentos	Doses	Codificação
Testemunha negativa	-----	-----
S. de cobre + O. de magnésio	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	Cu+MgO
S. de cobre+ GEOX [®]	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	Cu+GEOX
S. de cobre + O. de magnésio + Ferro	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹ + 0,04 kg/ha ⁻¹	Cu+MgO+Fe
S. de cobre + O. de magnésio + Sacarose	1 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹ + 0,5 kg/ha ⁻¹	Cu+MgO+Sacarose

Legenda: S. = sulfato; O. = óxido.

Fonte: Do autor (2024)

4.3.1 Preparo do extrato enzimático e determinação da atividade enzimática

Para as análises da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o extrato enzimático foi preparado a partir de 0,2g da amostra homogeneizada com 1,5mL do tampão de extração contendo: 375 μL de fosfato de potássio a 400mM (pH 7,8), 15 μL de EDTA (10mM), ácido ascórbico (200mM) e 1035 μL de água destilada. O extrato foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas supracitadas (BIEMELT et al.,1998).

Para a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente, 0,2g da amostra foi homogeneizada com polivinilpirrolidona (PVP) 1% e 1,5 mL do tampão de extração:fosfato de sódio a 50 mM (pH 6,5). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4° C e o sobrenadante foi coletado. Os extratos enzimáticos foram armazenados em freezer a -20°C até o início da determinação da atividade de todas as enzimas.

A atividade da SOD foi determinada conforme a metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977), a qual consiste na capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Foram adicionados 8 µL do extrato a 190 µL do meio de incubação composto por: fosfato de potássio a 100mM (pH 7,8), metionina 75 mM, EDTA 10 µm, NBT 1 mM, riboflavina 0,2 mM e água. As reações foram incubadas (lâmpada fluorescente de 30W) por 20 minutos. As leituras foram realizadas a 560nm.

A atividade da CAT foi avaliada conforme Havir e McHale (1987). A reação foi composta por uma alíquota de 6 µL do extrato enzimático e 180 µL do meio de incubação: 90 µL de fosfato de potássio a 200 mM (pH 7,0), 74 µL de água destilada e 9 µL de peróxido de hidrogênio a 250mM. A leitura da atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240nm a cada 15 segundos por 3 minutos, dado pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da POD foi determinada pela oxidação do guaiacol (URBANEK et al., 1991). A reação de 200 µL foi composta por 8 µL do extrato enzimático, fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,0), guaiacol a 50 mM e peróxido de hidrogênio a 125 mM (BIEMELT et al., 1998). Após a incubação a 30°C por 10 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 480 nm.

Para a determinação da PAL, alíquotas de 9 µL do extrato enzimático foram adicionados a 161 µL de uma mistura de 110 µL de Tris-HCl a 40mM (pH 8,8) e 51µL de L-fenilalanina a 87,5 mM. A solução foi incubada a 37°C por 60 min e a leitura da absorbância a 290 nm (EL SHORA, 2002; ZUKER, 1965).

Para a determinação da atividade específica das enzimas foi realizada a quantificação de proteína total de cada extrato enzimático (BRADFORD, 1976). Para a quantificação da proteína foi utilizado 0,2g do tecido foliar homogeneizado com fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,8), 0,1mM de EDTA e ácido ascórbico a 10mM, totalizando um volume de 1,5mL. O extrato foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para formação da alíquota de 3 µL para realização da leitura da absorbância a 595 nm. Todas

as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de microplacas (Epson Bioteck®) com 3 repetições técnicas. O controle foi constituído por todos os meios de reação de cada enzima e proteína total exceto a amostra.

4.3.2 Determinação de compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel e carotenoides

Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 horas conforme metodologia descrita por Spanos e Wrolstad et al. (1990). A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos teores de compostos fenólicos e o resíduo para a lignina.

Para a determinação dos compostos fenólicos foram utilizadas alíquotas de 150 µL do extrato metanólico homogeneizadas com 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N por 5 minutos. Após este período foram adicionados 150 µL de Na₂CO₃ 1M por 10 minutos e posteriormente, diluídas com 1 mL de água destilada. Após as amostras permanecerem à temperatura ambiente por uma hora, as leituras das reações foram realizadas a 725 nm. 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 quantificar a lignina, o resíduo foi mantido em estufa a 65°C por 15 horas. Após este período, foi adicionado aos tubos 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico: HCl 2M (1:10), os quais foram mantidos em banho-maria a 100°C por 4 horas. Após centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi descartado o sobrenadante, adicionado 1,5 mL de água destilada e descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, seguido de agitação *overnight* à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl P.A. Após o período de precipitação (4 horas a 4°C), foi realizada nova centrifugação, descarte do sobrenadante e o precipitado ressuspensionado em 2,0 mL de NaOH a 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada em a 280 nm e os valores calculados com base na curva padrão de lignina e expressos em µg de lignina por miligrama de tecido seco (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

Para a determinação dos teores de carotenoides, foi utilizado aproximadamente 1 g de folha, homogeneizada e macerada com acetona a 80%, conforme metodologia de Lichtenthaler e Welburn (1983). A solução foi filtrada e diluída em 10 mL de acetona. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm.

Todas as leituras foram realizadas utilizando-se 200 μL da solução. A quantificação dos compostos de carotenoides, fenólicos e lignina foi realizada no espectrofotômetro de microplacas PowerWave XS (Biotek®).

4.3.3 Quantificação de teores de clorofila A e B

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) da Universidade Federal de Lavras – UFLA. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e uma alíquota de 0,1g foi utilizada para extração em 10 mL de metanol grau HPLC a 80%. As amostras foram maceradas em gral com pistilo por 60 segundos. Posteriormente, o material foi filtrado em membranas de 0,45 μm (Milipore) e injetadas diretamente no sistema cromatográfico (LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001).

As análises cromatográficas foram realizadas em um HPLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A-HT e detector UV-Vis (SPD-20A). A coluna empregada para a separação foi a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 μm).

A metodologia de extração da clorofila foi adaptada de Lopes et al. (2022), Nakamura e Watanabe (1998), Mendes et al. (2007), Zapata e Garrido (1991), Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os padrões (clorofila A e B) foram adquiridos da Sigma-Aldrich/Merck. O composto referente à fase móvel e extração foi de grau analítico para HPLC: metanol (Merck).

O método utilizado para a quantificação dos teores de clorofila foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas foi realizada uma diluição de uma solução-estoque contendo os padrões (160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Clorofila A e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila B). Todas as soluções foram preparadas em metanol e foram sonificadas em ultrassom. A partir dessa solução-estoque, a faixa de construção das curvas analíticas foram preparadas variando a concentração de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras e os padrões foram eluídos em modo isocrático (100% metanol) à temperatura ambiente. O comprimento de onda utilizado foi de 665 nm para clorofila A e 652 nm para clorofila B, fluxo de 1,0 mL min^{-1} e volume de injeção de 20 μL . As injeções dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicata, sendo a identidade do analito confirmada pelo tempo de retenção e o perfil do pico da amostra comparado ao dos padrões.

Foram realizados procedimentos para padronização/validação do método utilizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de

quantificação (LQ), precisão e exatidão (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

A linearidade foi expressa por meio da equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2). Para LD e LQ, foram considerados os parâmetros relativos à curva analítica construída. Para a determinação dos limites, foram utilizadas as seguintes relações matemáticas: $LD = 3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica. A precisão foi realizada pela precisão intermediária. Para isso, foi realizada a análise, em 5 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração (0,5; 10; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo estimado o Coeficiente de Variação CV ao final das sucessivas repetições ($CV (\%) = (s/CMD) \times 100$, em que, s = estimativa do desvio-padrão; CMD = concentração média determinada). A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes (0,5; 10; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A recuperação foi determinada considerando a seguinte equação matemática: $\% \text{ Recuperação} = [(concentração \text{ medida}) / (concentração \text{ esperada})] \times 100$.

4.3.4 Quantificação e caracterização de isoflavonóides

As amostras foram maceradas e uma alíquota de 0,7g foi homogeneizada com 5 mL de metanol 80%. Após agitação em vórtex por 30 segundos, banho de ultrassom por 20 minutos, as amostras foram novamente agitadas por 30 segundos e centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 min.

As análises cromatográficas foram realizadas no mesmo equipamento HPLC Shimadzu, citado no item anterior (4.3.4). A metodologia utilizada a quantificação dos isoflavonóides foi adaptado de Klejdus et al. (2005), EMBRAPA (2015), Cesar (2006) e Hutabarat (2000). Os padrões (daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os compostos referentes à fase móvel foram de grau analítico para HPLC: metanol (Merck®) e ácido acético glacial (J.T.Baker®) e água tipo I obtida de um sistema Milli-Q®.

O método utilizado para a quantificação desses compostos foi da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas foi realizada a diluição de uma solução-estoque contendo os padrões (42,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da daideína; 41,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da gliciteína; 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da genisteína e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do coumestrol). Todas as soluções foram preparadas em metanol 80% e sonificadas em ultrassom. A partir dessa solução-estoque, a faixa de construção das curvas analíticas foram preparadas variando a concentração de 0,01 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi utilizado como fase móvel para a eluição do composto a solução de ácido acético a 2% em água (solvente A) e metanol (solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos em modo gradiente (25%B inicial; 75%B em 40 min; 75%B até 45min; 25%B em 55min e 25% até 60 min para retornar as condições iniciais) à 30 °C no forno. O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm para os compostos daidzeína, gliceteína, genisteína e 343 nm para o coumestrol, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 µm (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. As injeções dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicata, sendo a identidade do analito confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil do pico da amostra, comparado ao do padrão.

Para garantir a qualidade analítica dos resultados foram realizados procedimentos para padronização/validação do método semelhantes aos realizados na análise de clorofila citado anteriormente (item 4.3.4). Foram avaliados a seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

A seletividade foi realizada por adição padrão. Amostras foram fortificadas com o padrão dos analitos em questão. A linearidade foi expressa por meio da equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2). Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900. Para a determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram considerados os parâmetros relativos à curva analítica construída. A precisão foi realizada pela precisão intermediária. Para isso, foi realizada a análise em 5 dias diferentes de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração (Nível 1: 0,5 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e 0,1 µg mL⁻¹ coumestrol; Nível 2: 5 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e 2,5 µg mL⁻¹ coumestrol; Nível 3: 10 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e 5 µg mL⁻¹ coumestrol), sendo estimado o coeficiente de variação (CV) ao final das sucessivas repetições. A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes (Nível 1: 0,75 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e 0,5 µg mL⁻¹ coumestrol; Nível 2: 1 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e coumestrol; Nível 3: 10 µg mL⁻¹ daidzeína, gliceteína, genisteína e 5 µg mL⁻¹ coumestrol).

4.4 Análises estatísticas

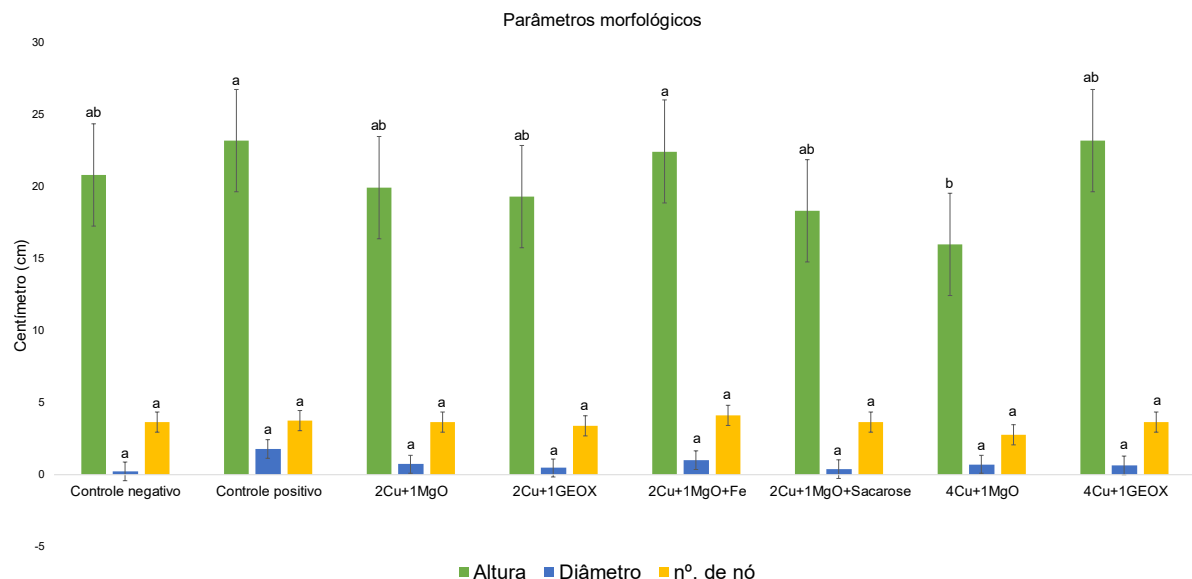
Os pressupostos da análise de variância foram verificados utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis significativas no teste F ($p \leq 0,05$) foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se software R[®] (R Core Team, 2019).

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: avaliação morfológica da soja e severidade do oídio

Para as variáveis diâmetro do caule e número de nós não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3). Entretanto, em relação à altura das plantas foram observadas diferenças significativas. O controle positivo e o tratamento Cu+MgO+Fe apresentaram os maiores valores (23,18 e 22,44 cm, respectivamente), enquanto as plantas de soja submetidas ao tratamento 4Cu+MgO registraram a menor altura (16cm), sendo este tratamento significativamente menor quando comparado ao controle negativo. Os demais tratamentos não se diferenciaram entre si.

Figura 3: Altura de planta, diâmetro e número de nó em função dos diferentes tratamentos aplicados via foliar na soja para o manejo do oídio.

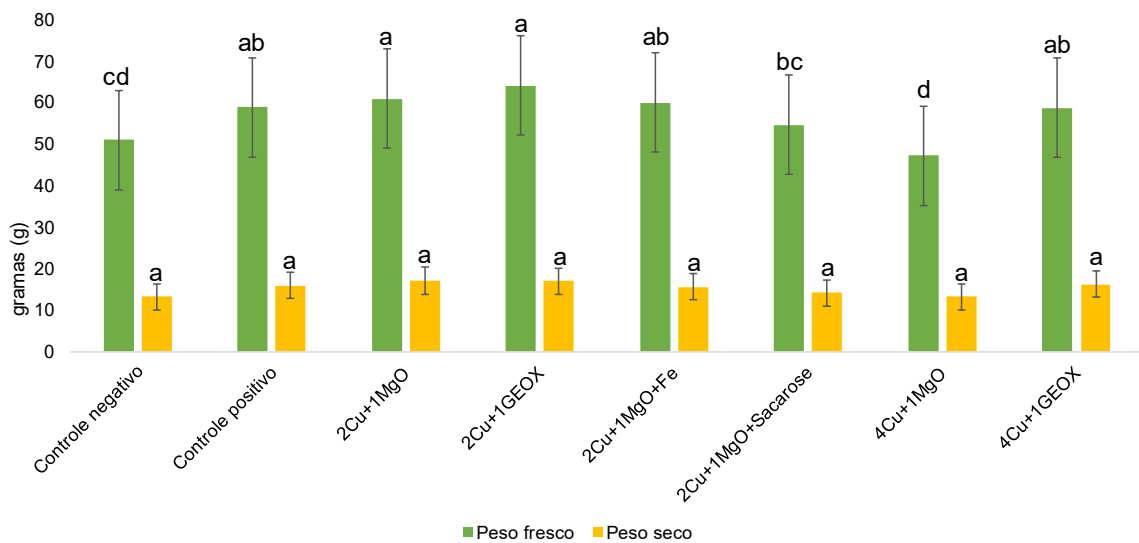


Legenda: Barras seguidas pela mesma letra minúscula, dentro do mesmo parâmetro, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

Para o peso seco não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 4). Já para o peso fresco da parte aérea foram encontradas diferenças entre os tratamentos. Os tratamentos Cu+GEOX[®] e Cu+MgO apresentaram os maiores valores de peso fresco (64,08 e 60,81 g respectivamente), um aumento de 20% em relação ao controle negativo (51,01g). O tratamento 4Cu+1MgO apresentou o menor peso fresco (47,24 g) em comparação aos demais tratamentos.

Figura 4: Peso fresco e seco da parte aérea da soja.

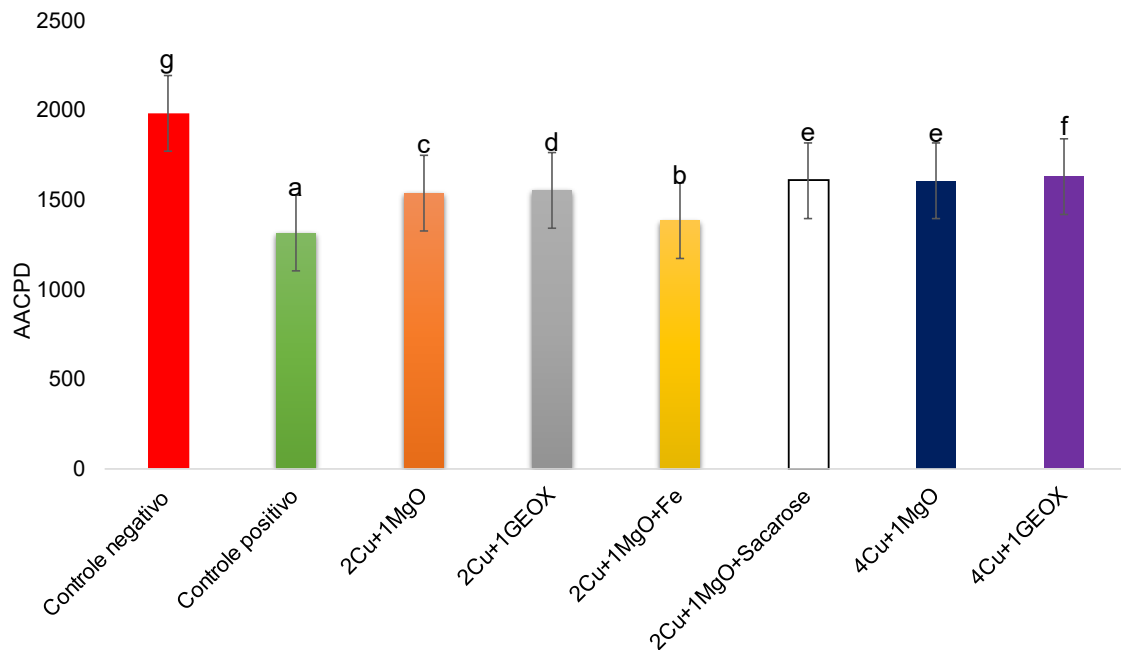


Legenda: Barras seguidas pela mesma letra minúscula, dentro do mesmo parâmetro, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$) para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 5). O controle positivo obteve o menor valor de AACPD (1314,60) em relação aos demais tratamentos, diferentemente do controle negativo, com o maior valor de AACPD (1987,88). O tratamento Cu+MgO+Fe apresentou uma média de AACPD igual a 1388,22, representando uma redução de 30% em comparação ao controle negativo. Os tratamentos Cu+MgO (1537,73) e Cu+GEOX (1553,64) apresentaram valores intermediários em comparação aos demais tratamentos. Os tratamentos 4Cu+1MgO e Cu+MgO+Sacarose não se diferenciaram estatisticamente, com valor de AACPD de 1606,34 e 1611,5 respectivamente. O tratamento 4Cu+1GEOX foi o que apresentou maior valor de AACPD (1634,38) em relação aos tratamentos à base de cobre.

Figura 5: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.



Legenda: Barras seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

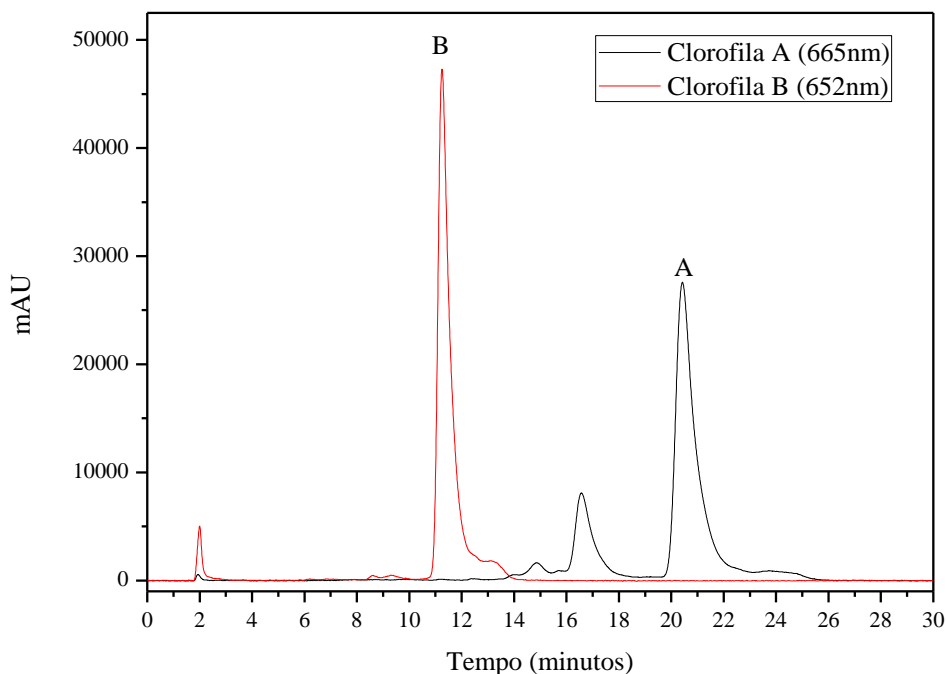
5.2 Experimento 2: análises bioquímicas

Os tratamentos 4Cu+1MgO e 4Cu+1GEOX apresentaram fitotoxidez e não foram avaliados neste trabalho em relação aos parâmetros bioquímicos. Quantidades excessivas de cobre (Cu^{2+}) podem levar a alterações fisiológicas, como danos às raízes, inibição da absorção de nutrientes, redução das taxas de fotossíntese e alterações nos compostos fenólicos (MARSCHNER 1995; MICHALAK 2006; MICHAUD et al., 2008, TOSELLI et al., 2009, LEQUEUX et al., 2010, CAMBROLLÉ et al., 2015; AMBROSINI et al., 2015).

5.2.1 Teor de Clorofila

Os teores de clorofila total (somatória da clorofila A e clorofila B) foram quantificados por HPLC-UV, onde foram obtidos os tempos médios de retenção dos padrões de clorofila A e B. O tempo de retenção para a clorofila A foi de $21,87 \pm 0,75$ minutos, enquanto para a clorofila B foi de $11,13 \pm 0,61$ minutos (Figura 6).

Figura 6: Cromatograma da solução-padrão dos compostos clorofila A e B na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Os coeficientes de correlação, LD, LQ, coeficiente de variância (CV) e exatidão (recuperação) obtidos para o método analítico empregado estão apresentados na Tabela 3.

Fonte: Do autor (2024)

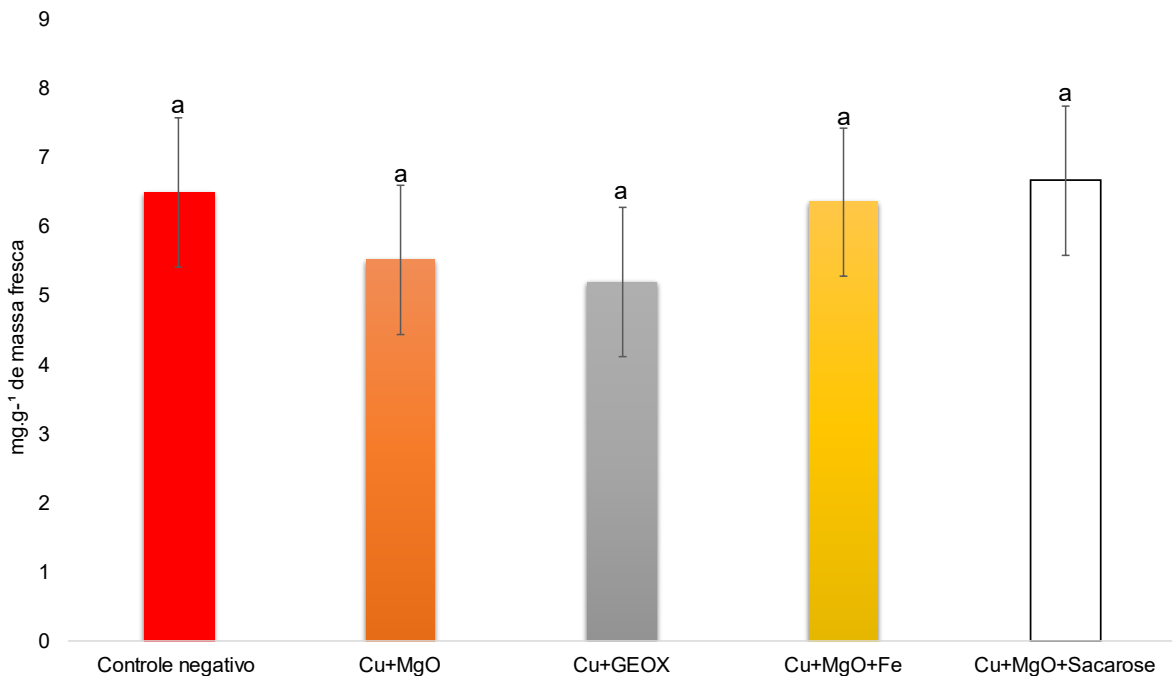
Tabela 4: Coeficientes de correlação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), coeficiente de variação (CV), precisão e exatidão dos padrões Clorofila A e B.

Parâmetros	Clorofila <u>A</u>	Clorofila <u>B</u>
R^2	0,99999	0,99998
LD (mg g^{-1})	0,049	0,022
LQ (mg g^{-1})	0,165	0,072
Recuperação (%)	80 a 105	85 a 108
CV (%)	1,14 a 2,13	0,97 a 3,46

Fonte: Do autor (2024)

Para os teores de clorofila total não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Figura 7), indicando que os tratamentos utilizados não influenciaram nessa variável. Os tratamentos apresentaram em média teores de clorofila variando entre 5,20 mg.g⁻¹ a 6,67 mg.g⁻¹ massa fresca para os tratamentos Cu+GEOX e Cu+MgO+Sacarose, respectivamente.

Figura 7: Teores de clorofila total (clorofila A+ B) em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.



Legenda: Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Fonte: Do autor (2024)

5.2.2 Teores de carotenoides

Não houve diferença entre os teores de carotenoides nos tratamentos avaliados (Figura 8). Os valores variaram entre 0,52 a 0,65 µg.mg⁻¹ (Cu+MgO e Cu+MgO+Fe, respectivamente).

Figura 8: Teores de carotenoides em função dos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.



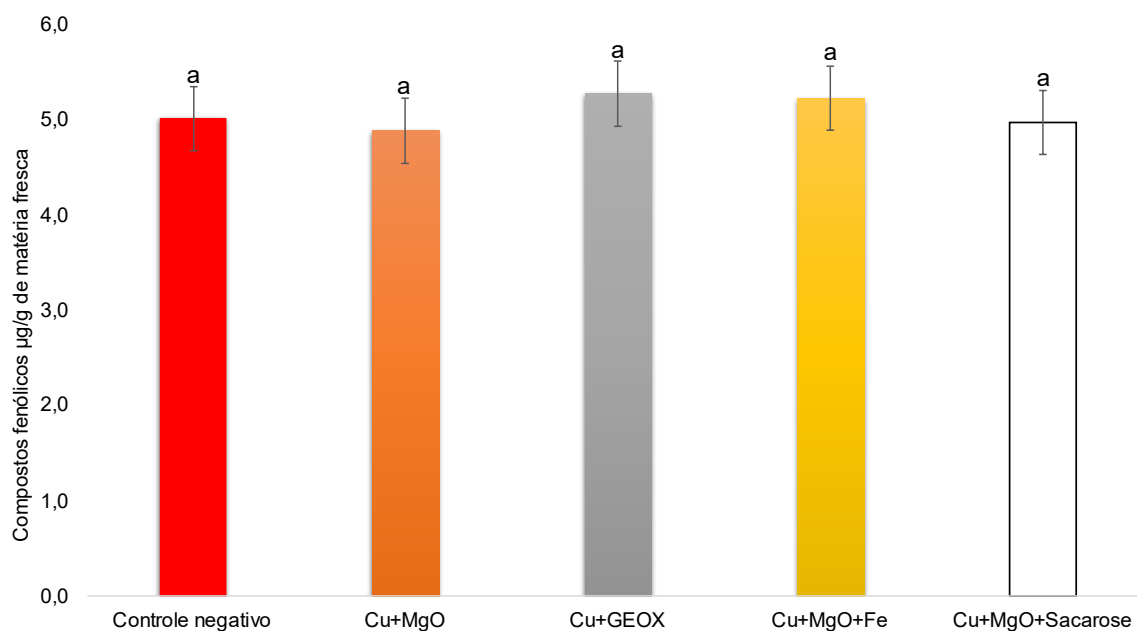
Legenda: Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Fonte: Do autor (2024)

5.2.3 Compostos fenólicos solúveis totais

Não houve diferença entre os teores dos compostos fenólicos solúveis totais dos tratamentos avaliados (Figura 9). Os valores variaram entre 4,88 e 5,27 µg.mg⁻¹ de matéria seca indicando que os tratamentos utilizados não influenciaram significativamente nos níveis de compostos fenólicos nas folhas de soja.

Figura 9: Teores dos compostos fenólicos solúveis totais em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.



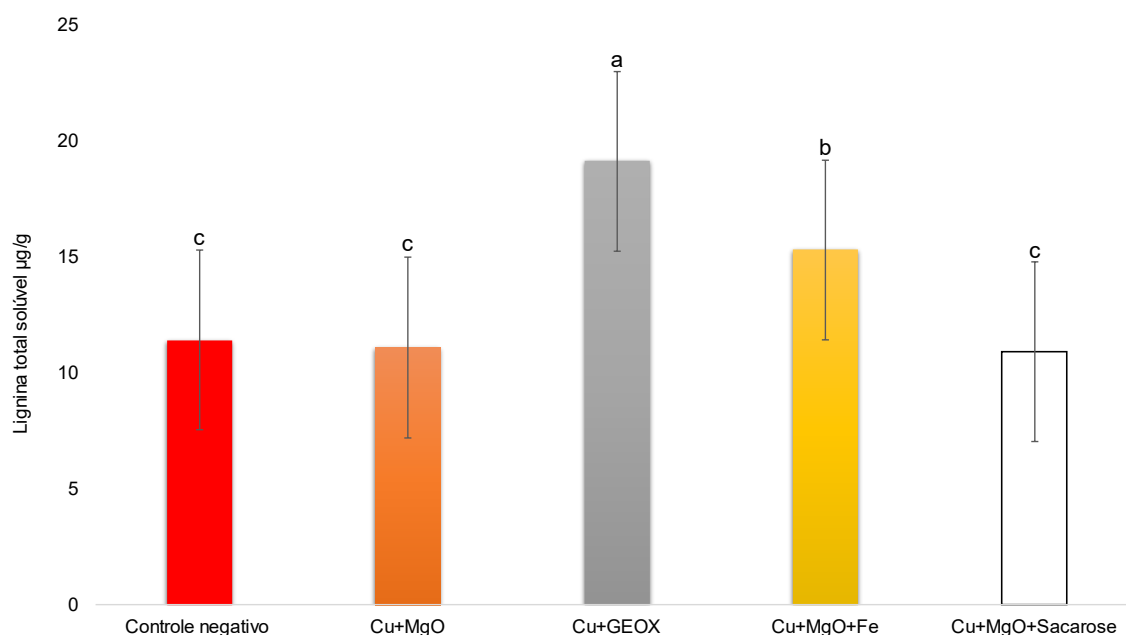
Legenda: Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Fonte: Do autor (2024)

5.2.4 Lignina solúvel

Para os teores de lignina solúvel foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 10). O tratamento Cu+GEOX apresentou o maior conteúdo de lignina ($19,12 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de matéria seca), correspondendo a um incremento de 19,98% em relação ao tratamento Cu+MgO+Fe ($15,30 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), que apresentou o segundo maior valor. Comparando o tratamento Cu+GEOX ao controle negativo ($11,42 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) observou-se um incremento de aproximadamente 40% nos teores de lignina. Os tratamentos controle negativo, Cu+MgO ($11,10 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) e Cu+MgO+Sacarose ($10,93 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) não diferiram entre si.

Figura 10: Teores de lignina total em função aos diferentes tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio em casa de vegetação.



Legenda: Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

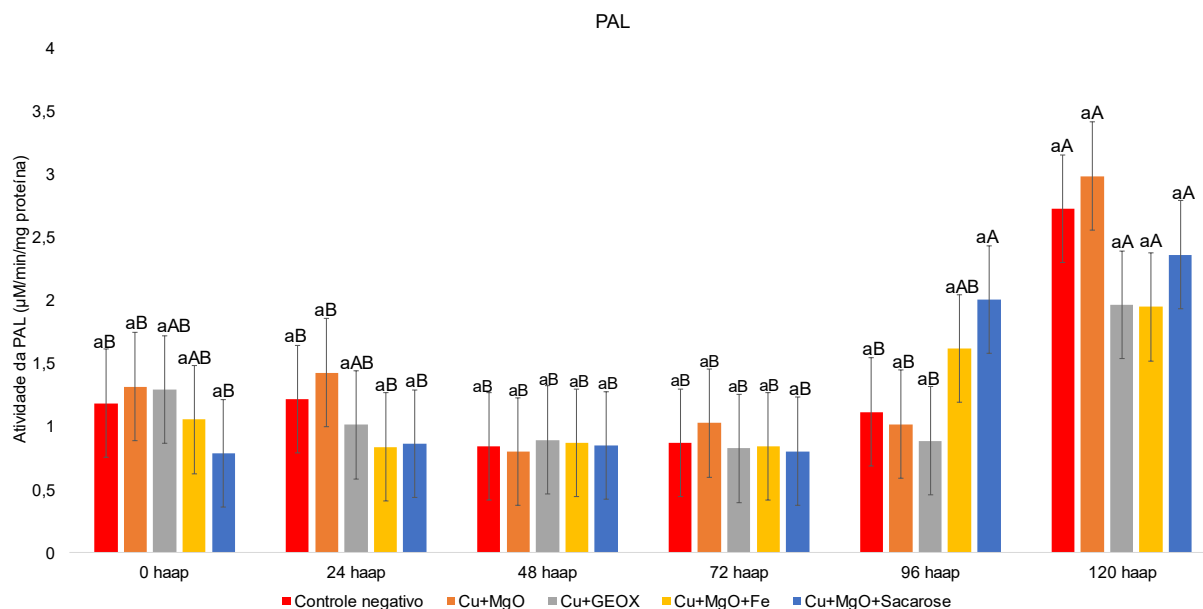
5.2.5 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

Não foi observada diferença da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) nas folhas de soja para os tratamentos avaliados dentro do mesmo tempo de coleta (Figura 11). Em relação aos diferentes tempos de coleta observou-se que todos os tratamentos apresentaram maior atividade da enzima após 120 haap. Em média todos os tratamentos do último tempo de coleta apresentaram um acréscimo de aproximadamente 15% na atividade da enzima em relação aos demais tempos.

As plantas pulverizadas com o tratamento Cu+MgO apresentaram maior atividade da enzima após 120 horas a aplicação atingindo o valor de 2,98 $\mu\text{M}/\text{min}$. Nos demais períodos de coleta não foram observados diferença significativa.

O tratamento Cu+GEOX apresentou a maior atividade enzimática 120 horas após a aplicação (1,96 $\mu\text{M}/\text{min}$), enquanto os menores valores foram registrados aos 48, 72 e 96 haap. Nos tempos 0 e 24 horas, a atividade da PAL não diferenciaram significativamente, apresentando valores intermediários em relação aos demais tempos de coleta.

Figura 11: Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).



Legenda: Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas (representam a comparação dos diferentes tratamentos no mesmo tempo de coleta) e mesmas letras maiúscula (representam a comparação do mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

No caso do tratamento Cu+MgO+Fe, a maior atividade enzimática foi constatada após 120 horas da aplicação (1,95 $\mu\text{M}/\text{min}$). Menores atividades da enzima foram observados nas coletas realizadas às 24, 48 e 72 haap, enquanto as atividades enzimáticas nos tempos de coleta de 0 e 96 haap não apresentaram diferença significativas em relação ao pico em 120 h e os menores valores obtidos nos demais tempos avaliados.

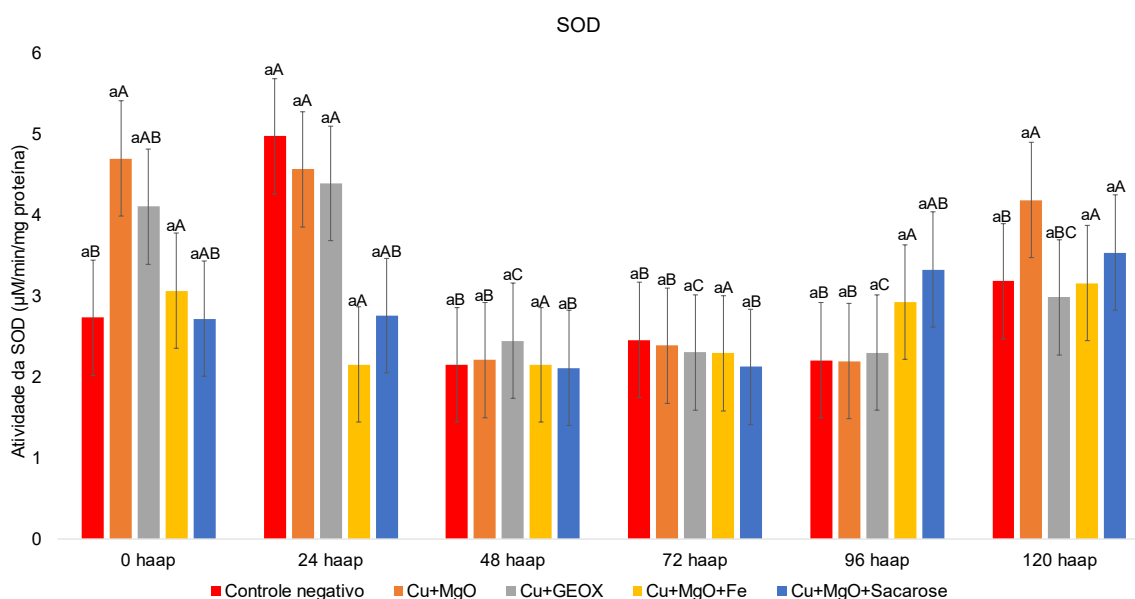
Plantas pulverizadas com Cu+MgO+Sacarose apresentaram um aumento da atividade da enzima ao longo do tempo após a sua aplicação. Os maiores valores foram registrados nas coletas de 96 e 120 haap (2 e 2,36 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). Nos tempos de coleta anteriores não foram registrados diferença significativa na atividade da enzima.

5.2.6 Superóxido dismutase (SOD)

Não foi observada diferença da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) entre os tratamentos para o mesmo tempo de coleta (Figura 12), somente em relação aos diferentes

tempos de coleta. Nos períodos iniciais (0 e 24 horas) e no último tempo de coleta (120 horas) após a aplicação dos tratamentos observou-se os maiores valores de atividade enzimática. Esse resultado foi semelhante nos tratamentos analisados, com exceção de plantas pulverizadas com Cu+MgO+Fe, as quais não apresentaram diferença na atividade da enzima entre os tempos de coleta avaliados.

Figura 12: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).



Legenda: Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas (que representam a comparação dos diferentes tratamentos no mesmo tempo de coleta) e letras maiúsculas (que representam a comparação do mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

Para o tratamento Cu+MgO verificou-se dois perfis de resposta em relação a atividade da SOD. No primeiro observou-se os maiores valores da atividade da enzima (4,70; 4,56 e 4,18 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente) às 0, 24 e 120 horas após aplicação do tratamento. Já no segundo perfil houve uma redução média de 49% nos valores da atividade enzimática nos períodos de 48, 72 e 96 haap (2,21; 2,38 e 2,19 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente).

Para o tratamento Cu+GEOX a maior atividade enzimática foi observada no tempo de 24 horas após a sua aplicação (4,39 $\mu\text{M}/\text{min}$), diferenciando-se do tempo 0h, com atividade de 4,10 $\mu\text{M}/\text{min}$. Os menores valores foram registrados nos períodos de 48, 72 e 96 horas após aplicação (2,45; 2,31 e 2,30 $\mu\text{M}/\text{min}$ respectivamente). Já no tempo de coleta de 120 horas, a

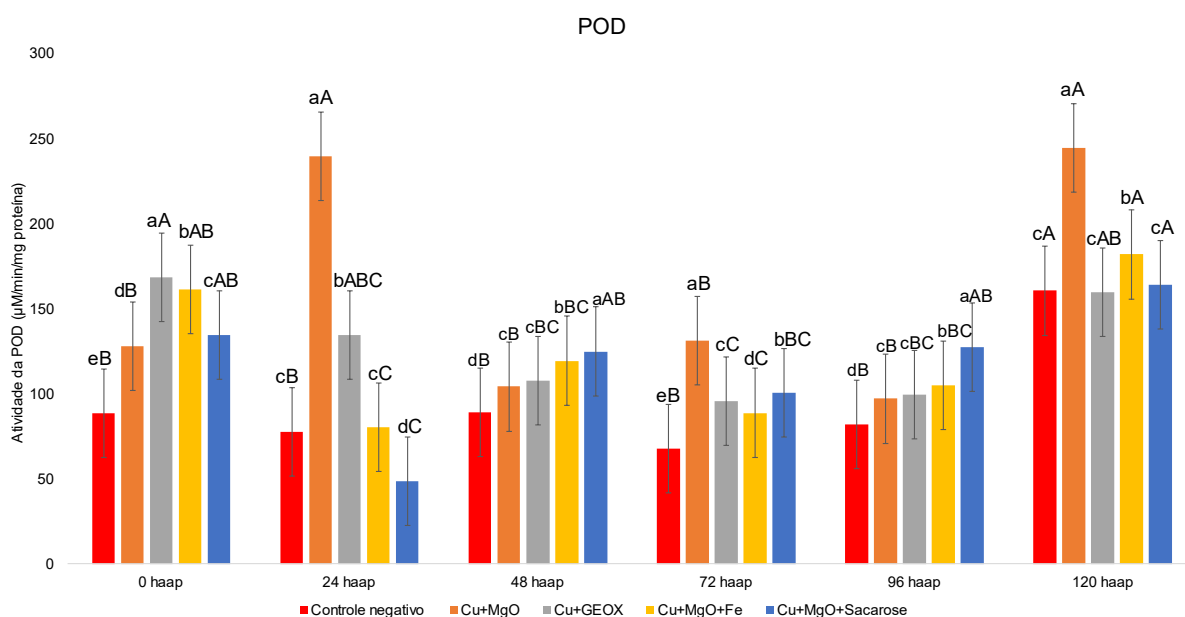
atividade enzimática deste tratamento foi de 2,98 $\mu\text{M}/\text{min}$, atividade intermediária em relação aos demais tempos avaliados.

A maior atividade da enzima para o tratamento Cu+MgO+Sacarose foi identificado no tempo de 120 horas após aplicação (3,54 $\mu\text{M}/\text{min}$), enquanto a menor atividade foi registrada nos períodos de 48 e 72 horas (2,11 e 2,12 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). Nos demais períodos de coleta não foram identificadas diferenças significativas.

5.2.7 Peroxidase (POD)

Diferenças significativas foram encontradas para a atividade da peroxidase (POD) na maioria dos tratamentos e tempos de coleta avaliados (Figura 13). A maior atividade enzimática foi observada 120 haap, enquanto a atividade da enzima nos tempos de coleta de 0 e 24 horas não apresentaram diferenças significativas entre si. Os tempos de 48, 72 e 96 horas após a aplicação dos produtos apresentaram uma redução na atividade da enzima em comparação com os tempos iniciais (0 e 24 horas). O controle negativo apresentou os valores mais baixos de atividade da enzima POD para todos os tempos de coleta, exceto o de 24h, em que tratamento Cu+MgO+Sacarose apresentou a menor atividade da POD.

Figura 13: Atividade da enzima peroxidase (POD) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).



Legenda: Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas (que representam a comparação dos diferentes tratamentos no mesmo tempo de coleta) e mesmas letras maiúscula (que representam

a comparação do mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

O tratamento Cu+MgO apresentou maior atividade da enzima nos tempos de 24 e 120 haap (240,1 e 245,19 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente), enquanto os demais tempos de coleta (0, 48, 72 e 96 h) foram significativamente semelhantes entre si, apresentando valores superiores a 97 $\mu\text{M}/\text{min}$ e inferiores a 140 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Para o tratamento Cu+GEOX, observou-se uma resposta diferente, onde a maior atividade da POD foi identificada no tempo 0 h (169,02 $\mu\text{M}/\text{min}$). A partir de 24 haap a atividade da enzima foi reduzida em 20% (134,70 $\mu\text{M}/\text{min}$) em comparação ao tempo anterior, mantendo essa redução até 72 horas após aplicação (95,84 $\mu\text{M}/\text{min}$). A partir de 96 horas identificou-se uma elevação na atividade da enzima (99,74 $\mu\text{M}/\text{min}$), onde foi possível observar no tempo de 120 horas o segundo maior registro da atividade (159,93 $\mu\text{M}/\text{min}$).

O tratamento composto por Cu+MgO+Fe, registrou a maior atividade enzimática às 120 haap (182,39 $\mu\text{M}/\text{min}$), seguido pelo tempo 0h, com 161,75 $\mu\text{M}/\text{min}$. Os tempos que apresentaram os menores valores da atividade enzimática foram 24 e 72 haap (80,56 e 89,07 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente).

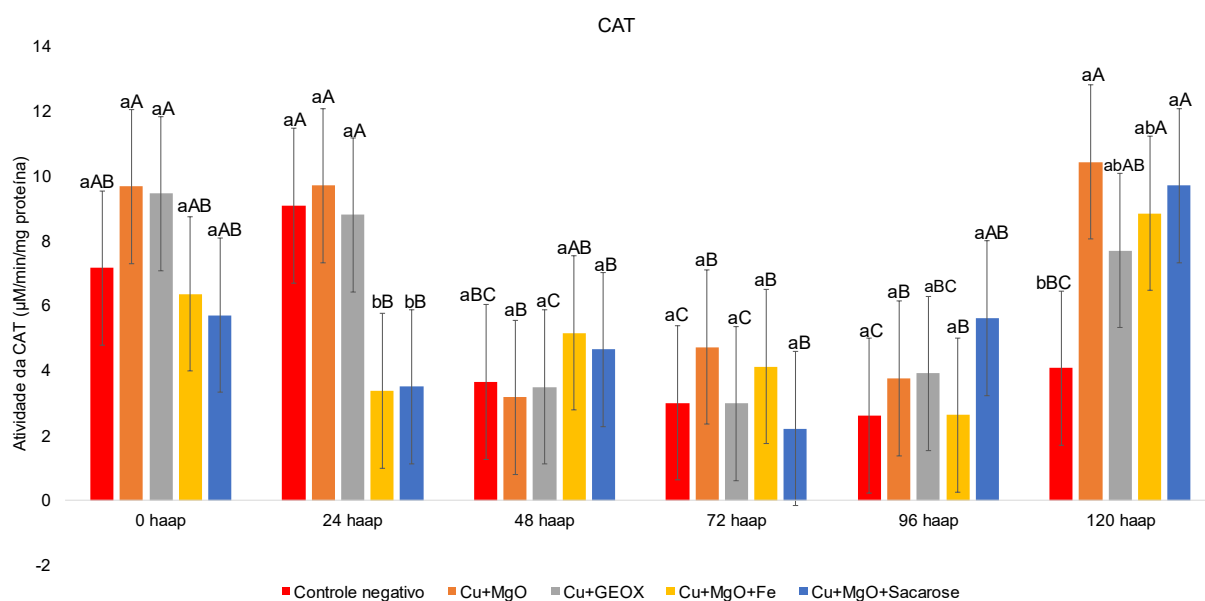
No tratamento Cu+MgO+Sacarose a maior atividade enzimática foi observada às 120 haap (164,62 $\mu\text{M}/\text{min}$). No tempo 0h, a atividade da enzima foi de 134,73 $\mu\text{M}/\text{min}$; após 24 horas, o valor registrado foi de 48,94 $\mu\text{M}/\text{min}$ o que correspondeu a uma redução de mais de 60% na atividade da enzimática quando comparado ao tempo de coleta 120 haap.

5.2.8 Catalase (CAT)

Para a atividade da catalase (CAT) foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos tanto dentro do mesmo tempo de coleta quanto nos diferentes tempos (Figura 14).

Ao analisar os tratamentos para o mesmo tempo de coleta, observou-se que às 0, 48 e 72 haap houve uma resposta semelhante. No entanto, no tempo de 24 horas a atividade enzimática foi superior para os tratamentos Cu+MgO e Cu+GEOX (9,71 e 8,80 $\mu\text{M}/\text{min}$), enquanto nos tratamentos Cu+MgO+Fe e Cu+MgO+Sacarose a atividade da enzima (3,38 e 3,51 $\mu\text{M}/\text{min}$) foi 40% menor quando comparado ao controle negativo (9,09 $\mu\text{M}/\text{min}$).

Figura 14: Atividade da enzima catalase (CAT) avaliada em folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos e analisada às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação dos produtos (haap).



Legenda: Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas (que representam a comparação dos diferentes tratamentos no mesmo tempo de coleta) e pelas mesmas letras maiúsculas (que representam a comparação do mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2024)

No tempo de 120 horas observou-se um perfil distinto, onde o tratamento Cu+MgO e Cu+MgO+Sacarose apresentaram os maiores valores da atividade enzimática (10,43 e 9,71 $\mu\text{M}/\text{min}$). Por outro lado, os tratamentos Cu+MgO+Fe e Cu+GEOX exibiram valores intermediários (8,85 e 7,71 $\mu\text{M}/\text{min}$), sendo superiores apenas ao controle negativo (4,08 $\mu\text{M}/\text{min}$).

A maior atividade enzimática foi observada nos tempos de 0, 24 e 120 haap. Em contraste, para 48, 72 e 96 horas evidenciou-se uma redução significativa de 49% em comparação com os demais tratamentos.

A atividade enzimática do tratamento Cu+MgO pode ser descrita pela formação de dois grupos distintos. O primeiro grupo apresentou a maior atividade da enzima nos tempos 0, 24 e 120 horas após aplicação, enquanto o segundo grupo exibiu valores mais baixos nos tempos de 48, 72 e 96 haap, correspondente a uma redução de mais 65% da atividade da enzima do segundo grupo para o primeiro.

O tratamento Cu+GEOX apresentou os maiores valores da atividade da enzima nos tempos 0 e 24 horas após aplicação (9,47 e 8,80 $\mu\text{M}/\text{min}$). Posteriormente, houve uma redução

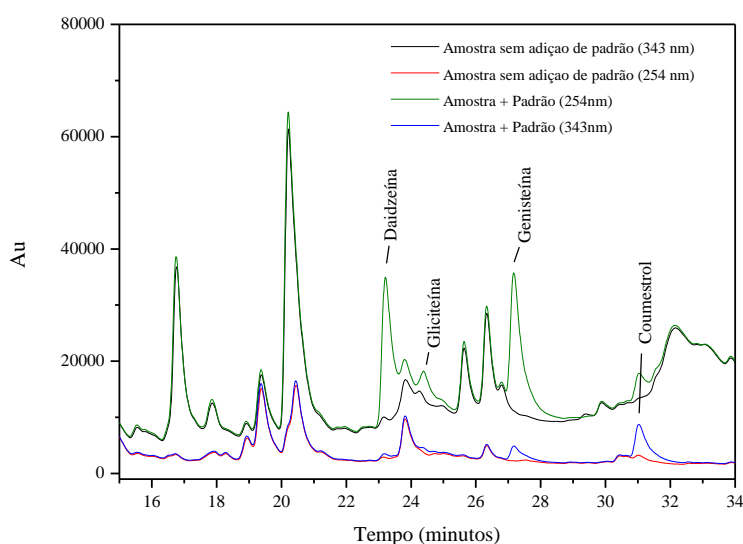
na atividade da enzima nos tempos de 48, 72 e 96 horas, e um aumento na atividade enzimática no tempo de 120 horas.

Para os tratamentos Cu+MgO+Fe e Cu+MgO+Sacarose foi observado uma resposta semelhante. Nos tempos de 0 e 120 horas após aplicação dos tratamentos foram registrados os maiores valores da atividade da enzima, enquanto nos tempos de 24 e 72 horas foram identificados os menores valores.

5.2.9 Detecção e quantificação dos isoflavonoides

A seletividade foi realizada por adição padrão comparando-se amostra sem adição dos analitos e com amostra fortificada com os analitos ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A separação não teve interferência da matriz na identificação dos compostos em análise (Figura 15).

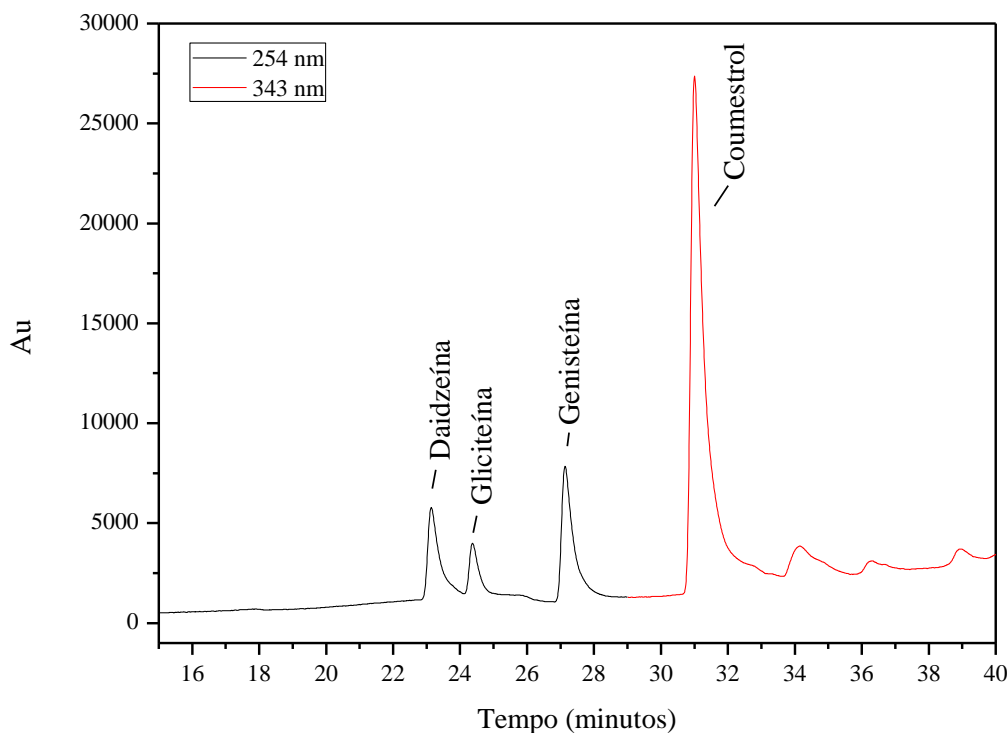
Figura 15: Cromatograma da amostra sem fortificação e com fortificação (seletividade).



Fonte: Do autor (2024)

O tempo médio de retenção obtido para os compostos analisados foram de $23,13 \pm 0,51$ minutos para daidzeína; $24,36 \pm 0,25$ minutos para gliciteína; $27,18 \pm 0,19$ minutos para genisteína e $31,022 \pm 0,78$ minutos para coumestrol (Figura 16).

Figura 16: Cromatograma da solução-padrão dos compostos daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol nas concentrações de 10, 5, 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Do autor (2024)

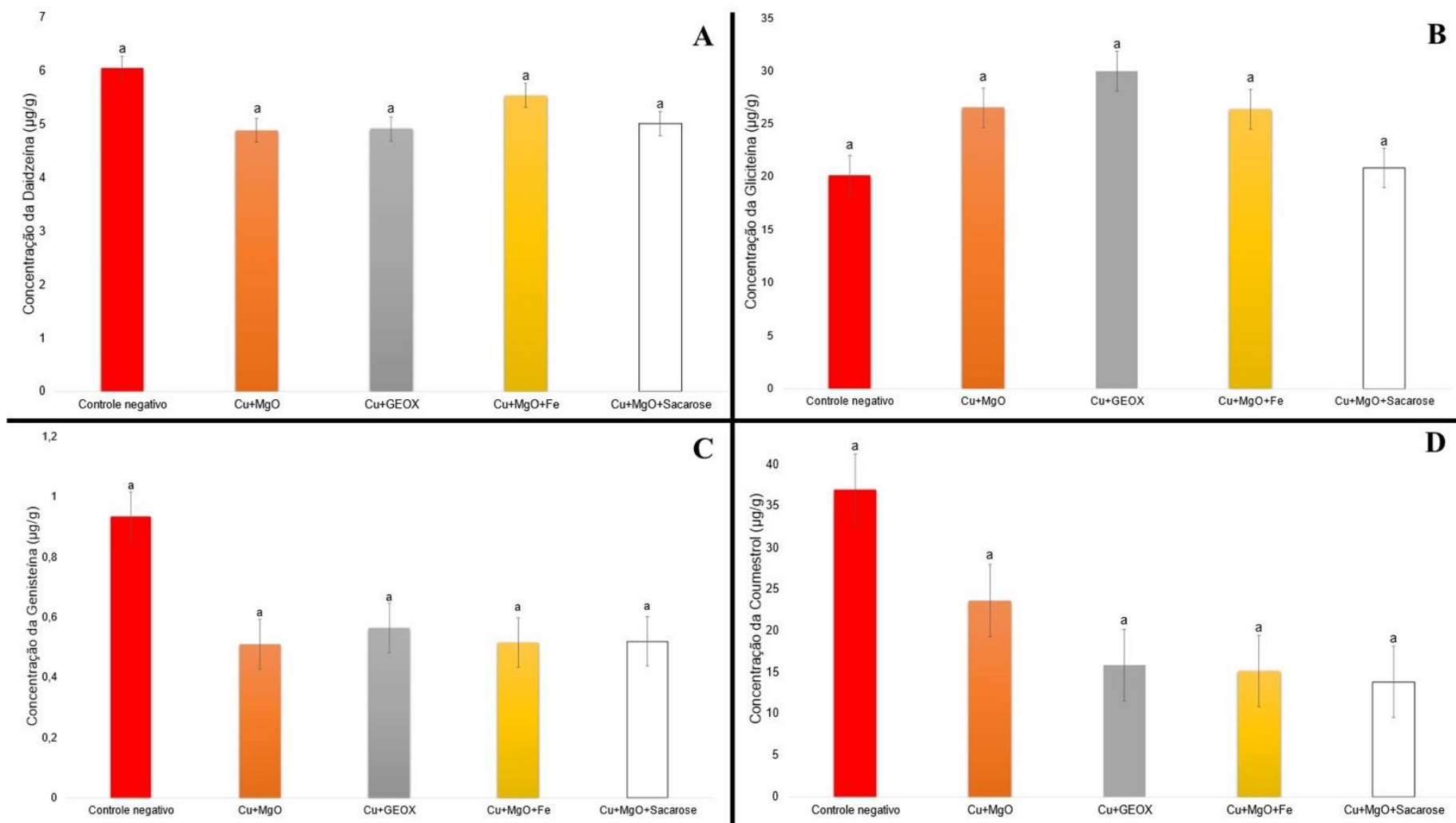
Os coeficientes de correlação, limites de detecção, quantificação, precisão (coeficientes de variação) e exatidão (recuperação) obtidos para o método analítico empregado estão apresentados na Tabela 4. Não foi observado diferença na concentração de todos isoflavonides avaliados (Figura 17).

Tabela 5: Coeficientes de correlação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão dos padrões daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol.

Parâmetros	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Coumestrol
B	94985,3	8425,8	106714,2	54925,8
A	-38589	-1214,3	-5195,8	-3474,8
R^2	0,99997	0,99998	0,99995	0,99996
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ou ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,21 ou 1,5	0,24 ou 1,71	0,05 ou 0,35	0,07 ou 0,5
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ou ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,71 ou 5	0,81 ou 5,78	0,17 ou 1,21	0,24 ou 1,71
Recuperação (%)	82 a 117	84 a 93	80 a 110	82 a 94
CV (%)	0,88 a 2,73	0,60 a 3,56	0,96 a 2,45	0,76 a 3,77

Fonte: Do autor (2024)

Figura 17: Teores de daidzeína, gliciteína, genisteína e coumestrol nas folhas de soja pulverizadas com diferentes tratamentos.



Legenda: Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Figura A: Daidzeína; Figura B: Gliciteína; Figura C: Genisteína e Figura D: Coumestrol. Fonte: Do autor (2024).

6 DISCUSSÃO

A busca por sistemas de manejo agrícola com a menor dependência de fungicidas sintéticos, visando o controle de doenças de forma sustentável e menos agressiva ao meio ambiente sem afetar a qualidade da produção está em constante crescimento (GUPTA, 2017; De PAULA et al. 2021). Nesse contexto, estudos sobre nutrientes minerais que ativam respostas de defesa latentes das plantas torna-se crucial. No entanto, a estimulação dessas defesas implica no redirecionamento de energia e os metabólitos primários o que representa um investimento significativo para a planta podendo afetar seu desenvolvimento (BURKETOVA et al. 2015).

O excesso de cobre (Cu^{2+}) podendo afetar negativamente o desenvolvimento das plantas causando alterações anatômicas e morfológicas, sendo que as plantas herbáceas são mais impactadas negativamente por excesso desse elemento (MARSCHNER, 1995; MICHALAK, 2006; MICHAUD et al., 2008, BURKHEAD et al. 2009; TOSELLI et al., 2009, LEQUEUX et al., 2010, CAMBROLLÉ et al., 2015; AMBROSINI et al., 2015). No presente estudo, os tratamentos aplicados via foliar em soja para o manejo do oídio não influenciaram as variáveis morfológicas em comparação ao controle positivo (fungicida comercial), esses resultados indicam que não houve redirecionamento de gasto energético de forma prejudicial para o desenvolvimento da planta, sendo possível estabelecer um perfil de normalidade no desenvolvimento das plantas, com ressalva para o tratamento 4Cu+1MgO, que apresentou os menores valores de altura de planta e peso fresco.

O cobre, além de um micronutriente essencial com atuação em diversos processos fisiológicos nas plantas, também é um fungicida de contato multi-sítio capaz de se ligar a sítios que interrompem o metabolismo do patógeno (POZZA, 2021; RESENDE et al., 2021). Neste estudo verificou-se uma redução no progresso da doença em todos os tratamentos avaliados, com valores de AACPD abaixo do controle negativo. Esse resultado pode ser atribuído a atuação do cobre. O uso de cobre no fortalecimento foliar da soja para proteção contra a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P.Syd.) foi estudado por Bedin et al. (2020). Segundo o referido autor a nutrição foliar com cobre aliada a tratamentos fitossanitários pode reduzir a severidade da ferrugem e aumentar o desempenho das plantas, sendo, uma alternativa promissora para um manejo sustentável.

Nesse cenário, o uso de nutrientes minerais, que têm a capacidade de mitigar os danos causados por doenças fúngicas na produtividade das culturas, tem sido apontado como uma

alternativa promissora de manejo de doenças (LEMES et al. 2011; MESQUITA et al. 2019; EINHARDT et al. 2020).

O cobre pode interferir na síntese e degradação de pigmentos como clorofilas e carotenoides (MYSLIWA et al., 2004; UPADHYAY e PANDA, 2009). Estudos conduzidos por Grotz, 2006; Taiz, 2009; Coelho, et al. 2018; Badinelli, 2019 e Franco et al., 2023, corroboram com a relação entre os níveis de clorofila e a produtividade. O excesso de cobre pode suprimir a síntese da clorofila e conseqüentemente, reduzir a produção de carboidratos (glicose e amido), que resulta no menor crescimento vegetativo das plantas. Silva (2000), evidencio que a pulverização de sacarose nas concentrações de 0,5 a 1% promoveu estímulos na fotossíntese em mudas de café depauperadas. Nesse estudo não foi possível observar diferença significativa nos teores de clorofila e carotenoides entre os tratamentos quando comparado ao controle negativo (sem aplicação de produtos). Nesse estudo não foi possível observar diferença significativa nos teores de clorofila e carotenoides entre os tratamentos sobre as diferentes variações das doses de cobre utilizadas neste estudo não influenciaram nos teores de clorofila A, B e carotenoides quando comparado ao controle negativo (sem aplicação de produtos).

Os fenólicos são sintetizados através de uma via da rota do chiquimato/fenilpropanóide. Para os teores dos compostos fenólicos solúveis totais não houve influência dos tratamentos avaliados em comparação com a testemunha. Os compostos fenólicos totais referem-se a uma ampla classe de compostos que podem se polimerizar e formar diversos produtos, como flavonoides, ligninas, taninos e outras subclasses de compostos que influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Esses compostos fenólicos também podem ser tóxicos aos microrganismos, sendo considerados mecanismos de defesa das plantas (YALPANI, 1994; RASKIN, 1992; SENARATNA et. al., 2000; NAZAR et al., 2011; SHARMA et al., 2019 e DONG & LIN 2021).

Moraes et al. (2009), observaram que o aumento no teor de lignina é influenciado por Cu e que existe uma competição desse elemento com outros micronutrientes, como o zinco (Zn) e o manganês (Mn), os quais são importantes em uma das fases da rota metabólica da síntese de lignina. Neste trabalho verificou-se que os teores de lignina solúvel da parte aérea da soja foram influenciados nos tratamentos Cu+GEOX e Cu+MgO+Fe. A combinação dos elementos contidos nos tratamentos pode ter provocado um efeito sinérgico em benefício das plantas. Esse evento sinérgico do Cu+Fe foi observado por Kitagishi e Yamane (1981) em mudas de arroz e por Lanaras et al. (1993), em plantas de trigo, além de Cambrollé et al. (2015).

Quando ocorre o excesso de Cu^{2+} resulta na elevação da concentração de espécies reativas de oxigênio, impactando diretamente ou indiretamente as vias metabólicas (LIU et al., 2018 e SALEEM et al., 2020 a,b). Estudos realizados por Upadhyay (2009), sobre a inibição do crescimento induzida pelo cobre, estresse oxidativo e alterações ultraestruturais em alface d'água recém-cultivada (*Pistia stratiotes* L.) constataram variações nas respostas das enzimas quando ocorre a exposição de diferentes concentrações de cobre. Para reduzir os possíveis danos, as plantas desenvolveram um sistema enzimático protetor que pode reduzir o stress oxidativo. Yusefi-Tanha (2020), também observou os fatores que afetam a toxicidade, e, segundo o referido autor, o tamanho de partícula, a concentração e a interações de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) afetam diretamente as sementes e o sistema de defesa antioxidante (SOD, CAT, POD) em soja.

No presente estudo as enzimas PAL e SOD não apresentaram diferença entre os tratamentos, observação da ausência dessa variação nas enzimas pode ser justificada devido ao fato dos níveis de cobre utilizados estarem abaixo do limite máximo que as plantas podem tolerar, conforme foi descrito por Marschner (2012) e Fidalgo et al. (2013). Entretanto no decorrer do tempo foi observado que a atividade dessas enzimas foram aumentando. Resultados semelhantes foram observados por Kováčik (2007) em estudos da relação da atividade PAL e dos compostos fenólicos na tolerância da camomila ao excesso de cádmio e cobre e verificaram que a atividade da PAL foi estimulada com a aplicação de cobre. O Cu induziu um aumento após 24 horas da aplicação e posteriormente diminuiu. Este fato pode ser explicado devido as propriedades redox do Cu, permitindo-lhe uma alta geração de EROs. Desse modo, as plantas podem aumentar o metabolismo fenólico e a atividade PAL para produzir fenólicos antioxidantes.

As enzimas CAT e POD apresentaram atividade distintas da enzima PAL, em relação as concentrações no decorrer dos tempos de coletas. Observou-se maior atividade nos primeiros e nos últimos tempos de coleta sendo verificado uma supressão nos tempos intermediários. Estudos realizados por Yu & Rengel (1999), Lombardi & Sebastiani (2005), Thounaojam et al. (2013), Elleuch et al. (2013), Thounaojam et al. (2014), Liu e Wang (2018), Hansel, et al. (2021), observaram aumento da atividade das referidas enzimas indicando a capacidade do cobre em alterá-las. Devi e Prasad (1998), Lombardi e Sebastiani (2005), reportam que quando o cobre está presente em excesso pode promover e estimular a geração de espécies reativas de oxigênio, levando a um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes.

A produção e o acúmulo de isoflavonóides é uma característica quantitativa controlada por múltiplos fatores bióticos e abióticos (HOECK et al. 2000; LEE et al. 2003; BERGER et al., 2008; ANGURAJ et al., 2016; TSUNO et al., 2018 e MATSUDA et al., 2020). Nas análises dos isoflavonóides mais característicos nas plantas de soja, o coumestrol e o grupo das agliconas composto por daidzeína, genisteína e gliciteína, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, estudos conduzidos por Sugiyama et al., (2016) analisando a regulação do desenvolvimento das plantas de soja associado ao balanço nutricional verificaram que quando a soja foi cultivada sob condições limitadas de nitrogênio e fósforo, o conteúdo tecidual e a composição das isoflavonas não foram alterados significativamente. Mas, de acordo com os autores, na análise dos exsudatos radiculares, observaram aumento de 8 e 15 vezes em daidzeína e genisteína, respectivamente, e redução em malonildaidzina e daidzina, demonstrando a relação entre o estado nutricional sobre a secreção de isoflavonas das raízes da soja.

Há uma limitação de estudos sobre a correlação de eliciadores minerais sobre o aumento da produção de isoflavonóides associado as respostas das enzimas antioxidantes. A identificação dos compostos por HPLC vem sendo utilizado com maior frequência para as análises qualitativa e quantitativa de isoflavonas principalmente em produtos de soja (FUKUTAKE et al., 1996; HUI et al., 2001; DUNCAN et al., 2003; GASPARETTO et al., 2012 e LEE et al., 2015).

O presente trabalho é um estudo que expõe as possibilidades da utilização de elementos minerais como cálcio, cobre e magnésio para promover a indução de resistência da planta utilizando o método de análise por HPLC como uma alternativa confiável para quantificar as principais isoflavonas em matrizes mais complexas.

A compreensão sobre a utilização de eliciadores minerais sobre o estímulo da produção isoflavonóides é uma linha de pesquisa promissora a qual pode ser relacionada à indução de resistência das plantas.

7 CONCLUSÕES

A aplicação foliar de 1 Kg/ha⁻¹ de sulfato de cobre associado a 0,5 Kg/ha GEOX é uma alternativa promissora no manejo de oídio na cultura da soja. Esses produtos podem atuar como eliciadores para ativar o complexo de enzimas antioxidantes que reduz as espécies reativas de oxigênio sem causar prejuízos no desenvolvimento das plantas além de proporcionar maior teor de lignina.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária, Abastecimento (MAPA). Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 out, 2022.
- AISYAH, S. et al. Modulation of isoflavonoid composition of *Rhizopus oryzae* elicited soybean (*Glycine max*) seedlings by light and wounding. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 36, p. 8657-8667, 2013.
- AKIMASA NAKAMURA & TADASHI WATANABE. HPLC determination of photosynthetic pigments during greening of etiolated barley leaves Evidence for the biosynthesis of chlorophyll a'. **Federation of European Biochemical Societies Letters** 426 (1998) 201-204.
- ALMEIDA, H. O. et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2012.
- AMBROSINI, V. G. et al. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 270-280, 2015.
- ANGURAJ VADIVEL, A. K. et al. Soybean isoflavonoids: role of GmMYB176 interactome and 14-3-3 proteins. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 391-403, 2016.
- ANJUM, N.A. et al. Catalase and ascorbate peroxidase representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Nantes [s.l.], v.23, n.19, p.19002-19029, 2016.
- APPU, M. et al. An overview of plant defense-related enzymes responses to biotic stresses. **Plant Gene**, v. 27, p. 100302, 2021.
- ARDILA H. D.; MARTÍNEZ, S. T.; HIGUERA B. L. Levels of constitutive flavonoid biosynthetic enzymes in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars with differential response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1233–1245, 2013.
- ATHAYDE SOBRINHO C, FERREIRA P. T, CAVALCANTI L.S. Indutores abióticos. In: Cavalcanti L. S, Di Piero R. M, Cia P, Pascholati, S. F, Resende M. L. V, Romeiro, RS (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz pp.51-80, 2005.
- BABITHA, M. P. et al. Differential induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and-susceptible genotypes of pearl millet. **Plant Pathology**, v. 51, n. 4, p. 480-486, 2002.

BADINELLI, P. G., JUNIOR, D. F. U., & de MORAES, F. A. Estratégias de descompactação de solos hidromórficos cultivados com soja. In **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, pp. 3-10, 2019.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93–107, 2004. <http://dx.doi.org/10.1079/SSR2004159>.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231–239, 2010.

BARZ, Wolfgang; WELLE, Roland. Biosynthesis and metabolism of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in chickpea, soybean and phytopathogenic fungi. In: **Phenolic metabolism in plants**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 139-164.

BASHIR, Z. et al. Tomato plant proteins actively responding to fungal applications and their role in cell physiology. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 257, 2016.

BATÍNÍC-HABERLE, I.; TOVMASYAN, A.; SPASOJEVIC, I. Uma visão geral educacional dos aspectos químicos, bioquímicos e terapêuticos das porfirinas Mn - desde a dismutação do superóxido até as vias acionadas por H₂O₂. **Biologia redox**, v. 5, p. 43-65, 2015.

BEDENDO, I. P. Oídios. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2011. p. 473 – 477.

BEDIN, E. et al. Foliar fortification of Copper (Cu) in Glycine max L. for the protection against Asian Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.). **Plant Science Today**, v. 7, n. 4, p. 551–558-551–558, 2020.

BERGER M.; RASOLOHERY C. A.; CAZALIS R, DAYDÉ J. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. **Crop Sci** 48:700–708. 2008.

BEZERRA, J. D. Cordeiro et al. Biossíntese de lignina em plantas submetidas ao déficit hídrico. **Pubvet**, v. 14, p. 132, 2020.

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**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998. Disponível em: <<http://www.plantphysiology>>.

BLANCHARD, R.W.; REHM, G.; CALDWELL, A.C. Sulfur in plant materials by digestion with nitric and perchloric acid. **Soil Science Society of America Journal**, v. 29, n.1, p.71-72, 1965.

BOERJAN, W.; W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p.519-546, 2003.

BOLLER, T., & FELIX, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, 60(1), 379–406, 2009.

- BORÉM, A. Escape Gênico. Revista de **Biotecnologia**, Brasília, DF. n. 10, p. 101-107. Set/Out 1999.
- BORGES, L. P., & AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BOUDET, Alain-M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant physiology and biochemistry**, v. 38, n. 1-2, p. 81-96, 2000.
- BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**. v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and Stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-11, 1992.
- 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.
- BRINATE, S. V. B. et al. Teores foliares de cobre no cafeeiro arábica submetido aos efeitos da adição de cal ao sulfato de cobre. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 2015, Curitiba. Resumos. Vitória: Embrapa Café. p. 77-78. 2001.
- BURKETOVA, L., TRDA, L., OTT, P. G., & VALENTOVA, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology advances**, 33(6), 994-1004, 2015.
- BURKHEAD, J. L., et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, 182(4), pp.799-816, 2009.
- C. B. Avaliação fenotípica e de metabólitos secundários de genótipos de soja resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática. **Jornada Acadêmica da Embrapa Soja 2015** in: GHIZONI, PAS et al. Avaliação fenotípica e de metabólitos secundários de genótipos de soja resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática. 2019.
- CAMBROLLÉ, et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, 120, 171-178, 2015.
- CARRÃO-PANIZZI, et al. Effects of genetic and environment on isoflavone contents of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34; 1787p-1795p, 1999.
- CASTRO, C. de et al. Magnésio: manejo para o equilíbrio nutricional da soja. **Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E)**, 2020.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, p. 192-208, 2004.
- CHUNG, W. H. Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. **Journal of Microbiology** 55: 409-416, 2017.

COELHO, A. P. et al. Estimativa da produtividade de grãos da aveia-branca cultivada sob níveis de irrigação utilizando clorofilômetro portátil: Imagem: StockPhotos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, 9(2), 662-667, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: **CONAB**, v. 8, p. 1-108, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso: 27 jul. 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: **CONAB**. **BOLETIM DA SAFRA DE GRÃOS**, 5º levantamento – safra 2022/2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso: 11 fev. 2023.

COSTA, L. C. et al. "Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*." **Nativa** 7.2 (2019): 126-132.

CUNHA, R. L. et al. Controle químico da Ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Coffee Science**, Lavras, v.7, n.1, p. 42-49, jan./abr. 2012.

DALL'AGNOL, Amélio. A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições. Embrapa Soja - Livro técnico. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 71 p.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [s.l.], v.2, p.1-13, 2014.

DE LIMA, L. D., et al. Avaliação bioquímica e fisiológica em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) submetida ao indutor de resistência acibenzolar-s-metil. **Diversitas Journal**, 5(4), 2374-2393, 2020.

DE OLIVEIRA. Luiz Edson Mota. Temas em Fisiologia Vegetal. Disponível em: <<http://www.ledson.ufla.br/metabolismo-secundario/compostos-fenolicos/>>. Acesso em 16 de outubro de 2023.

DE PAULA, Samuel et al. Potential of resistance inducers for soybean rust management. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 43, n. sup2, p. S298-S307, 2021.

DE RESENDE, M. L. V et al. Strategies for coffee leaf rust management in organic crop systems. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1865, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091865>

DE RESENDE, M. L. V. et al. Strategies for coffee leaf rust management in organic crop systems. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1865, 2021.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, Gilmar Ribeiro. **Elementos Requeridos à Nutrição de Plantas**. Viçosa: SBCS, p. 93-132, 2007.

DELAUNOIS, et al. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. **Front. Plant Sci.** 5, 2014.

DEVI, S. R., & PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant science**, 138(2), 157-165, 1998.

DEWICK, P. M.; Medicinal natural products: a biosynthetic approach 3. ed. New York: **John Wiley & Sons**, 539 p, 2009.

DINIZ, L. P. et al. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 171-179, Apr. 2006.

DONG, Nai-Qian; LIN, Hong-Xuan. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. **Journal of integrative plant biology**, v. 63, n. 1, p. 180-209, 2021.

DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M.; Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011, Chap.9, p.178-203.

DUNCAN A. M, PHIPPS W. R, KURZER M. S. Phyto-oestrogens. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 17:253–271, 2003.

DURBIN, R. D. The mechanisms for self-protection against bacterial phytotoxins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 313-329, 1988.

DURRANT, W. E., DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42, 185– 209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>. 2004.

EINHARDT A. M, FERREIRA S, HAWERROTH C, VALADARES S. V, RODRIGUES F. A. Nickel potentiates soybean resistance against infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Pathol.** 69(5):849–859. doi:<https://doi.org/10.1111/ppa.13169>, 2020.

ELLEUCH, A., et al. Morphological and biochemical behavior of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) under copper stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, 98, 46-53, 2013.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, n. 1, p. 1-7, 2002.

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Características da soja. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja>> Acesso em: 25 set. 2024.

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa lança cultivar de soja resistente à ferrugem na Tecnoshow. 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79335812/embrapa-lanca-cultivar-de-soja-resistente-a-ferrugem-na-tecnoshow>> Acesso em: 25 set. 2024.

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. História da soja. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>> Acesso em: 21 set. 2022.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e perspectivas**. São Paulo: Editora Planta, 2^a ed., 2004.

EROMOSELE, O.; BO, S.; HUJIA PING, L. Preparative isolation and purification of glyceollins from soy bean elicited with *Aspergillus sojae* by high-speed countercurrent chromatography. **J Chromatogr Sep Technol**, v. 3, p. 1-7, 2012.

FAQUIN, V. NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS. Lavras: **Centro de Editoração/faepe**, p. 186, 2005.

FERNANDES, C. de F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

FIDALGO, F., et al. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. **Food and Energy Security**, 2(1), 70-80, 2013.

Franco, A., et al. Copper toxicity in maize: the severity of the stress is reduced depending on the applied Fe-chelating agent. **Journal of Plant Growth Regulation**, 42(3), 1567-1581, 2023.

FUKUTAKE M, et al. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food Chem Toxicol** 34:457–461, 1996.

FURLAN, M. R. et al. Eugenol na indução de fitoalexina no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Fitos**, v. 15, n.1, p. 53-59, 2020.

GASPARETTO, J. C., et al. Development and validation of an HPLC–DAD method for analysis of the six major isoflavones in extracts from soybean processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 89, 1211-1222, 2012.

GHIZONI, P. A. S, GRAÇA, J. P., DIAS, B. F., ABELHA, A., UEDA, T. E., SALVADOR, M. C., OLIVEIRA, M. F., NUNES, E. O., HOFFMANN-CAMPO, C. B. Avaliação fenotípica e de metabólitos secundários de genótipos de soja resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática. In **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso**. In: Jornada Acadêmica da **Embrapa Soja**, 10., 2015.

GHIZONI, P. A. S.1,3; GRAÇA, J. P. 3, DIAS, B. F.1,4; ABELHA, A.1,3; UEDA, GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 315-318, 1977.

GIANNOPOLITIS, C. N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n.2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle do oídio na safra 2020/2021: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, v. 178, 2021.

GOUJON, T. et al. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 677-687, 2003.

GROTZ, N.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 595-608, 2006.

GUPTA, Nitika et al. Role of nutrients in controlling the plant diseases in sustainable agriculture. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume 2: Applications in Crop Production and Protection**, p. 217-262, 2017.

HANSEL, F. B. et al. Nutrição mineral como aliada das plantas na tolerância a estresses ambientais. **Informações Agronômicas NPCT**, v. 1, p. 10-24, 2021.

HAUDENSHIELD, J. S. et al. Molecular methods for pathogen detection and quantification. **Compendium of Soybean Diseases and Pests, American Phytopathological Society**, p. 131-135, 2015.

HASSEN, G. O Brasil da soja - Abrindo Fronteiras, Semando Cidades; **L&PM**: Porto Alegre, Brasil, 1996.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in Tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HOECK, J. A. et al. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop science**, v. 40, n. 1, p. 48-51, 2000.

HOU, S. et al. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 646, 2019.

HUI, Ed et al. Genistein and daidzein/glycitein content in tofu. **Journal of food composition and analysis**, v. 14, n. 2, p. 199-206, 2001.

HUTABARAT, L. S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 43-58, 2001.

Huth, C.; Mertz-Henning, L. M.; Lopes, S. J.; et al. Susceptibility to weathering damage and oxidative stress on soybean seeds with different lignin contents in the seed coat. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 296–304, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v38n4162115>.
IGLESIAS-GARCÍA, R., RUBIALES, D., FONDEVILLA, S. Penetration resistance to Islam, K. S., Ali, M. M., Shahrin, S., Cheesman, S., Alam, S. N., and Krupnik, T. J. (2022).

JINAL, H. N.; SAKTHIVEL, K.; AMARESAN, N. Characterisation of antagonistic *Bacillus paralicheniformis* (strain EAL) by LC–MS, antimicrobial peptide genes, and ISR determinants.

Antonie Van Leeuwenhoek, v. 113, p. 1167-1177, 2020.doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01423-4>.

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

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p.439-59, 1994.

KIM, Jin-Ae; CHUNG, Ill-Min. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 3, p. 496-503, 2007.

KIRKMAN, Henry N.; GAETANI, Gian F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007.

Kitagishi, K., & Yamane, I. (1981). Heavy metal pollution in soils of Japan. JAPAN SCI. SOC. PRESS, 2-10 HONGO, 6-CHOME, **BUNKYO-KU, TOKYO**, 113, JAPAN. 1981.

KLEJDUS, B. et al. Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5848-5852, 2005.

KOVÁČIK, J.; BAČKOR, Martin. Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 185, p. 185-193, 2007.

KRISHNAMURTHY, P; WADHWANI, A. Antioxidant enzymes and human health. **Antioxidant enzyme**, v. 1, p. 3-18, 2012.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F., KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J. N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 2018. v. 38, n. 3, p. 28.

LANARAS, T. et al. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, v. 88, n. 2, p. 307-314, 1993.

LATA, C.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, Manoj. Drought stress responses and signal transduction in plants. Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: **Functional Genomics Perspectives**, Volume 2, p. 195-225, 2015.

LEE, Mi Jin et al. High resolution LC–ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products. **Food Chemistry**, v. 176, p. 254-262, 2015.

LEE, S. J. et al. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**, v. 81, n. 2-3, p. 181-192, 2003.

- LEHMAN, S.G. Powdery mildew of soybean. **Phytopathology**, n.37, p.434, 1947.
- LENZONI, Gioia; LIU, Junli; KNIGHT, Marc R. Predicting plant immunity gene expression by identifying the decoding mechanism of calcium signatures. **New Phytologist**, v. 217, n. 4, p. 1598-1609, 2018.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 603, n. 1, p. 591-592, 1983.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, Claus. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- LIU, HAI-FENG et al. Copper ions suppress abscisic acid biosynthesis to enhance defence against *Phytophthora infestans* in potato. **Molecular plant pathology**, v. 21, n. 5, p. 636-651, 2020.
- LIU, J. et al. Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. e0203612, 2018.
- LIU, J. et al. "Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. **The Plant Journal** v. 50, n. 3, p. 529-544, 2007.
- LOMBARDI, L.; SEBASTIANI, L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Plant science**, v. 168, n. 3, p. 797-802, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.012>
- LORENZETTI, E. et al. Indução de resistência à macrofomina phaseolina em soja tratada com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45–50, 2018.
- LOURENÇO-LOPES, C. et al. A HPLC-DAD method for identifying and estimating the content of fucoxanthin, β -carotene and chlorophyll a in brown algal extracts. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100095, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100095>
- LUAN, S, Wang C. Mecanismos de sinalização de cálcio entre os reinos. Annu Rev Cell Dev Biol 37:311–340, 2021. In: SILVA, Marcos Marchesi da. **Mudanças no perfil metabólico de *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) resultantes do estresse hídrico e cultivo em nitrato como fonte única de nitrogênio**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ZAPATA, M.; GARRIDO, J. L. Influence of injection conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. **Chromatographia**, v. 31, p. 589-594, 1991.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de Plantas**. CERES. São Paulo. 2006 638 p.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: **POTAFOS**, 201p, 1997.

MANIKANDAN, A., PARTHASARATHY, R., ANUSUYA, S., & JIANYING, H. An overview of plant defense-related enzymes responses to biotic stresses. **Plant Gene**, 100302, 2021.

Mariana, A.; Marinela, P.; Rev. Roum. Chim 2007, 52, 537. In: CARVALHO, A. A. et al. Isoflavonoides da tribo dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, p. 1294-1311, 2020.

MARODIN, Josué C. et al. Yield of tomato fruits in relation to silicon sources and rates. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 220-224, 2014.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London, ENK. **Academic Press**, 889 p. 1995.

MARSCHNER, Horst. Mineral nutrition of higher plants 2nd edn. **Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim: Germany**, 1995.

MARSCHNER, Horst (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2011.

MARTINELLI, L. et al. Soy expansion and socioeconomic development in municipalities of Brazil. **Land**, v. 6, n. 3, p. 62, 2017.

MATSUDA, Hinako et al. Diurnal metabolic regulation of isoflavones and soyasaponins in soybean roots. **Plant Direct**, v. 4, n. 11, p. e00286, 2020.

MENDES, Carlos R.; CARTAXANA, Paulo; BROTAS, Vanda. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 5, n. 10, p. 363-370, 2007.

MENDES, C. R.; CARTAXANA, P.; BROTAS, V. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 5, n. 10, p. 363-370, 2007.

MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; DA SILVA, Juliano Cesar. Trichoderma: uso na agricultura. **Embrapa Soja-Livro científico (Alice)**, 2019.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish journal of environmental studies**, v. 15, n. 4, 2006.

MISSÃO, M. R. Maringá Management: **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n.1 - p.7-15, 2006.

MITRA, Debasis et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis: plant growth improvement and induction of resistance under stressful conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 13, p. 1993-2028, 2021.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v.22, n.1, p.11-19, 2017.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.261-284, 1998.

MORAES, S. R. G. et al. Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de silício e cobre. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 31, p. 283-291, 2009.

MYŚLIWA-KURDZIEL, B.; PRASAD, M. N. V.; STRZAŁTKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 146-181.

NAIR, Prakash M. Gopalakrishnan; CHUNG, Ill Min. 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, p. 342-352, 2014.

NAKAMURA, A.; WATANABE, T. HPLC determination of photosynthetic pigments during greening of etiolated barley leaves: Evidence for the biosynthesis of chlorophyll a'. **FEBS letters**, v. 426, n. 2, p. 201-204, 1998.

NAKANO, Y.; ASADA, Kozi. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAKATA, R. et al. Inducible de novo biosynthesis of isoflavonoids in soybean leaves by *Spodoptera litura* derived elicitors: tracer techniques aided by high resolution LCMS. **Journal of chemical ecology**, v. 42, p. 1226-1236, 2016.

NASCIMENTO, V. R. **Avaliação nutricional e sistema antioxidante em plantas jovens de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) submetidas à diferentes doses de Cádmio**. 2019. Tese de Doutorado. UFRA.

NAZAR, R. et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 8, p. 807-815, 2011.

NOJOSA GBA, RESENDE M. L. V, RESENDE A. V (2005) Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**. pp. 139-153.

NUNES, J. F et at., Estudo da interação entre *Trichoderma harzianum* e *Phaseolus vulgaris* utilizando a técnica de transformação aleatória por *Agrobacterium tumafasciens* (AMT). 2018. Dissertação (Mestrado) - **Universidade de Brasília**, Brasília.

PASCHOLATI, S. F. et al. Indução de resistência novos conceitos e aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas**. Lavras, MG, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 5.ed. Ouro Fino: Ceres. v. 1, cap. 35, p. 423-452, 2018.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v. 1, p. 417-454, 1995.

PÉREZ-LABRADA, F. et al. Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. **Plants**, v. 8, n. 6, p. 151, 2019.

Performance Liquid Chromatography of Chlorophylls and Carotenoids. **Chromatographia** Vol. 31, No. 11/12, June 1991.

PIETERSE, Corné MJ et al. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

PIETERSE, C. MJ et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014.

PIRAYESH, N. et al. Organellar calcium signaling in plants: An update. **Biochimica et biophysica Acta (bbA)-molecular Cell Research**, v. 1868, n. 4, p. 118948, 2021.

Pozza, E. A (2021). Diagnosticar e controlar doenças. Em GR Carvalho, AD Ferreira, VT Andrade, CE Botelho, & JPF Carvalho (Eds.), **Cafecultura do cerrado** (pp. 347–429). EPAMIG.

POZZA, E. A, POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: **Simpósio avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**, 12:259-281. 2012.

POZZA, E. A, POZZA, A. A. A. Coffee plant diseases affected by nutritional balance. 2023.

RASKIN, Ilya. Role of salicylic acid in plants. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 439-463, 1992.

RASTOGI, S.; DWIVEDI, U. N. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 264-277, 2008.

REIS, A. et al. Principais doenças das brássicas causadas por fungos, oomicetos e protozoário: identificação e manejo. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2021.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized vírus infections in plantts. **Virology**, v. 14, p. 340-358, 1961.

SALEEM, M. H. et al. Foliar application of gibberellic acid endorsed phytoextraction of copper and alleviates oxidative stress in jute (*Corchorus capsularis* L.) plant grown in highly copper-contaminated soil of China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 37121-37133, 2020.

SALEEM, M. H. et al. Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 5211-5221, 2020.

SARAVANAN, T., BHASKARAN, R., MUTHUSAMY, M. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymatological changes in banana roots again Fusarium wilt disease. **Plant. Pathol. J.** 3 (2), 72–80, 2004.

SARKER, U.; OBA, S. Salinity stress enhances color parameters, bioactive leaf pigments, vitamins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus* leafy vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2275-2284, 2019. doi: 10.1002/jsfa.9423.

SARTORATO, A.; YORINORI, J. T. Oídio de leguminosas: feijoeiro e soja. In: STADINIK, M. J.; RIVERA, M.C. (Ed.). Oídios. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p.255-284, 2001. SCANDALIOS, J.G. **Oxygen stress and superoxide dismutases**. *Plant Physiology*, v.101, p.7-12, 1993.

SILVA, J. C. da. Efeito da aplicação de sacarose no teor e no metabolismo de carboidratos em mudas de café (*Coffea arabica* L.) com diferentes níveis de reservas de carbono. 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. A. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F. A.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. Interação planta-patógeno: **Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, cap. 6, p. 227-248.

SENARATNA, T.; Touchell, D.; Bunn, E.; Dixon, K. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regul.** 2000, 30, 157–161.

SHANER, G.; FINNEY, R. R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing in knox wheat. *In: Phytopathology*. [s.l.: s.n.]p. 1052–1056.

SHARMA, A. et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2452, 2019.

SHARMA, S.; KAUR, A.; BANSAL, A.; GILL, B. S. Positional effects on soybean seed composition during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 353–359, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0341-0>.

Sharma, V.; Ramawat, K. G. Em *Natural Products*; Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., eds.; **Springer-Verlag**: Berlin Heidelberg, 2013, cap. 60.

SILVA, O. C. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metílico associados a fungicidas para o controle de doenças foliares na cultura da soja. **Tropical plant pathology**, v. 38, p. 72-77, 2013.

SILVA, C.M. da et al. Controle alternativo do míldio da videira com extrato aquoso de cinamomo e óleo vegetal. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 587-594, Dec. 2012.

ISLAM, Kh S. et al. Simple and effective management methods that can improve soybean production in **Bangladesh**. 2022.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 2012.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica**, Chapadinha, v.1, n.1, p.9-19, 2007.

SOLINO, A. J. S. et al. Accumulation of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1073-1078, out./dez., 2017.

SONG, Hyuk-Hwan et al. Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage. **Metabolomics**, v. 10, p. 833-841, 2014.

SOUZA, J. L.; Resende, P. **Manual de horticultura orgânica**. 2ªed. Aprenda Fácil. 843 p. 2003.

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.

STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23, Campinas. Resumos. Campinas: **Grupo Paulista de Fitopatologica/Instituto Biológico**, 2000. P. 176-181.

STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. Oídios. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 484 p. 2001.

STADNIK, M.J.; MAZZAFERA, P. Interações oídio-hospedeiro. In: STADNIK, M. J.; RIVERA M. C. (ed.). Oídios. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2001. p.79-118.

STAEL, S. et al. Plant organellar calcium signalling: an emerging field. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1525-1542, 2012.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-18, 2011.

STANGARLIN, J. R.; TARTARO, E. L.; PASCHOLATI, S. F. Caracterização de locais de infecção de *Exserohilum turcicum* em genótipos de milho. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 1, p. 1-13, 2022.

STEPHENIE, S. et al. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103917, 2020.

SUGIYAMA, A. et al. Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 89-94, 2016.

SWANSON, S.; GILROY, S. ROS in plant development. **Physiologia Plantarum**, v.138, p.384-392. 2010.

T. E.2,3; SALVADOR, M. C.3; OLIVEIRA, M. F.3; NUNES, E. O.3; HOFFMANN CAMPO, TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2009.

TEIXEIRA, R. A.; REIS, AJS; ROCHA, M. R. Mecanismos de resistência a fitodoenças. **Goiania: Universidade Federal de Goiás**, 2011.

DA COSTA C., Isabela et al. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. **Journal of Chromatography B**, v. 836, n. 1-2, p. 74-78, 2006.

THOR, K. Calcium—nutrient and messenger. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 440, 2019.

THOUNAOJAM, T. C. et al. Zinc ameliorates copper-induced oxidative stress in developing rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, v. 251, p. 61-69, 2014.

THOUNAOJAM, Thorny Chanu et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant physiology and biochemistry**, v. 53, p. 33-39, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.006>

TIAN C, WANG C, GAO Q, LI EU, LUAN S(2020b) Picos, ondas e oscilações de cálcio no desenvolvimento vegetal e interações bióticas. *Plantas naturais* 6:750–759.

TOVMASYAN, A. et al. Uma avaliação abrangente da atividade semelhante à catalase de diferentes classes de terapêutica redox-ativa. **Biologia e Medicina dos Radicais Livres**, v. 86, p. 308-321, 2015.

Tsuno, Y., Fujimatsu, T., Endo, K., Sugiyama, A. e Yazaki, K. (2018). "Saponinas de soja: uma nova classe de exsudados radiculares em soja (*Glycine max*)." *Fisiologia Vegetal e Celular*, 59, 366-375. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx192>.

Upadhyay, R. K., & Panda, S. K. (2009). Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Comptes rendus biologiques**, 332(7), 623-632.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.13, p.43-50, 1991.

USHA, T. N.; DADLANI, M. Study of free radical and peroxide scavenging enzymes and content in different vigour lots of soybean (*Glycine max*). **Legume Research**, v. 39, n. 2, p. 233–236, 2016. <http://dx.doi.org/10.18805/lr.v0iOF.8409>.

VENEGAS-MOLINA, J. et al. Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and Arabidopsis after treatment with elicitor molecules. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 10319, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67074-7>.

VEREMEICHIK, G. N. et al. Increase in isoflavonoid content in Glycine max cells transformed by the constitutively active Ca²⁺ independent form of the AtCPK1 gene. **Phytochemistry**, v. 157, p. 111-120, 2019.

WALTERS, Dale R.; RATSEP, Jaan; HAVIS, Neil D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WANG, Xiaojing et al. Analysis and review of trichomes in plants. **BMC plant biology**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021. (<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02840-x>).

WANG, W., G. GONG, X. WANG, L. WEI-LAPIERRE, H. Cheng, R. Dirksen & S. S. Sheu. 2016a. **Mitochondrial flash**: integrative reactive oxygen species and pH signals in cell and organelle biology. *Antioxidants Redox Signalling* 25: 9.

WELINDER, Karen G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, n. 3, p. 388-393, 1992.

with callose apposition or hypersensitive response. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 381–387, 2015.

YALPANI, N. et al. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Planta**, v. 193, n. 3, p. 372-376, 1994.

YU, O.; SHI, J.; HESSION, A. O.; MAXWELL, C. A.; McGONIGLE, B.; ODELL, J. T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 63, p. 753-763, 2003.

YU, Q.; RENGEL, Z. Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. **Annals of Botany**, v. 83, n. 2, p. 175-182, 1999.

YUAN, Peiguo et al. Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 38, p. 173-183, 2017.

YULIA, E. et al. Resistance Potential to Powdery Mildew (*Microsphaera diffusa* Cooke and Peck) of Several Yellow and Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) Genotypes. **KnE Life Sciences**, p. 270-278, 2017.

YUSEFI-TANHA, E. et al. Particle size and concentration dependent toxicity of copper oxide nanoparticles (CuONPs) on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (*Glycine max* cv. Kowsar). **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136994, 2020.

ZAPATA, M.; GARRIDO, J. L. Influence of injection conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. **Chromatographia**, v. 31, p. 589-594, 1991.

ZHANG, M.; COAKER, G. Harnessing effector-triggered immunity for durable disease resistance. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 912-919, 2017.

ZHAO, H. et al. Melatonin alleviates chilling stress in cucumber seedlings by up-regulation of CsZat12 and modulation of polyamine and abscisic acid metabolism. **Sci. Rep.**, pp. 1-12, 2017.

ZUCKER, Milton. 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, 1965.