

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**EFEITOS DE FERTILIZANTES NITROGENADOS NO
PATOSSISTEMA *Puccinia triticina-Triticum aestivum***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Simone Grippa Minuzzi

Santa Maria/RS, Brasil

2015

I

EFEITOS DE FERTILIZANTES NITROGENADOS NO PATOSSISTEMA *Puccinia triticina-Triticum aestivum*

Simone Gripa Minuzzi

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em produção vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

Orientador: Prof. Ricardo Silveiro Balardin

Santa Maria/RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gripa Minuzzi, Simone
EFEITOS DE FERTILIZANTES NITROGENADOS NO PATOSSISTEMA
Puccinia triticina-Triticum aestivum / Simone Gripa
Minuzzi.-2015.
46 p.; 30cm

Orientador: Ricardo Silveiro Balardin
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2015

1. Triticum aestivum 2. peróxido de hidrogênio 3.
guaiacol-peroxidase 4. nutrição mineral I. Silveiro
Balardin, Ricardo II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DE FERTILIZANTES NITROGENADOS NO
PATOSSISTEMA *Puccinia triticina-Triticum aestivum***

elaborada por
Simone Grippa Minuzzi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ricardo Silveiro Balardin, PhD.
(Presidente/Orientador)

Ivan Francisco Dressler da Costa, Dr. (UFSM)

Mônica Paula Debortoli, Dra. (INSTITUTO PHYTUS)

Santa Maria/RS, 23 de Janeiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço à minha família, em especial ao meu pai Luiz Carlos Minuzzi, minha mãe Cledi Gripa, meu irmão Felipe Gripa Minuzzi, minha tia Silda Teresinha Minuzzi, meu primo Marcelo Gripa Madalosso e meu padrasto Aldonir Rosseto Barcelos.

Ao Professor Ricardo Silveiro Balardin e sua esposa Clarice Rubin Balardin pelos seis anos de convivência, por terem me acolhido, pelos conselhos, pela orientação não só neste trabalho, mas também em tantos outros que foram substanciais para o meu crescimento profissional e pessoal. E especialmente ao meu orientador Ricardo Silveiro Balardin pela grande ajuda, paciência e ensinamentos ao longo da vida acadêmica e principalmente nos últimos dois anos que trabalhamos junto para realização deste trabalho, sendo grande incentivador em todas minhas conquistas acadêmicas.

Ao Professor Ivan Francisco Dressler da Costa e a Doutora Mônica Paula Debortoli pelo apoio, incentivo e orientação não somente na condução deste trabalho, mas também em outros momentos profissionais e pessoais.

A todos os amigos que fiz durante seis anos de pesquisa no Instituto Phytus, às amigas de apartamento Luciana Cardoso Alves e Aline Alves Courtes por terem me dado apoio, atenção e alegrias ao longo deste período.

Às meninas do laboratório de Fisiologia Vegetal Camila Pelegrinotti Tarouco, Liana Veronica Rossato e Júlia Gomes Farias pela amizade, orientação e grande ajuda no decorrer dos últimos meses.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido na realização deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e não foram lembrados meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Quantificação de Proteínas Solúveis 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação dos tratamentos.....30
- Figura 2** – Atividade da enzima Guaiacol-Peroxidase 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação dos tratamentos.....31
- Figura 3** – Peroxidação Lipídica 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação dos tratamentos.....32
- Figura 4** – Quantificação de Peróxido de Hidrogênio 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação dos tratamentos.....33
- Figura 5** – Área abaixo da curva de progresso de ferrugem da folha do trigo, cultivar Quartzo. Itaara/RS. 2014.....37
- Figura 6** – Produtividade e Peso de mil grãos na cultivar Quartzo com diferentes tratamentos. Itaara/RS.....37
- Figura 7** – Peso de Hectolitro na cultivar Quartzo com diferentes tratamentos. Itaara/RS. 2014.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos aplicados em plantas de trigo em condições de casa de vegetação. Itaara/RS, 2014.....	14
Tabela 2 – Condições ambientais no momento da aplicação fora da casa de vegetação.....	15
Tabela 3 - Parâmetros químicos e físicos dos solos nos dois locais onde foram conduzidos os experimentos.....	20
Tabela 4 – Tratamentos aplicados na cultivar de trigo Quartzo em condições de campo, Safra 2014. Itaara, RS.....	22
Tabela 5 – Condições meteorológicas nas aplicações dos tratamentos sob a cultivar Quartzo, Safra 2014. Itaara, RS.....	22
Tabela 6 – Severidade de <i>Puccinia triticina</i> na cultivar de trigo Quartzo. Itaara/RS. 2014.....	36

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Escala fenológica BBCH para os cereais de inverno.....	45
---	-----------

SUMÁRIO

ARTIGO: EFEITOS DE FERTILIZANTES NITROGENADOS NO PATOSSISTEMA <i>Puccinia triticina-Triticum aestivum</i>	9
Resumo.....	9
Abstract	10
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Experimento 1	13
Experimento 2	19
Resultados e Discussão.....	25
Conclusão	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Efeitos de fertilizantes nitrogenados no patossistema *Puccinia triticina*-*Triticum aestivum*

Simone Grippa Minuzzi⁽¹⁾, Ricardo Silveiro Balardin⁽¹⁾, Ivan Francisco Dressler da Costa⁽²⁾, Marcelo Grippa Madalosso⁽³⁾, Júlia Gomes Farias⁽⁴⁾, Camila Peligrinotti Tarouco⁽⁴⁾ e Liana Verônica Rossato⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, Av. Roraima, CEP 97111-970, Santa Maria, RS. E-mail: minuzzi.sg@gmail.com, balardin@balardin.com. ⁽²⁾ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Defesa Fitossanitária, Av. Roraima, CEP 97111-970, Santa Maria, RS. E-mail: ifdresler@gmail.com. ⁽³⁾ Instituto Phytus, Itaara, RS. E-mail: mgmadalosso@yahoo.com.br ⁽⁴⁾ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Biologia, Av. Roraima, CEP 97111-970, Santa Maria, RS. E-mail: fariasjuliag@hotmail.com, milatarouco@gmail.com, liana.rossato@gmail.com.

RESUMO

Resumo - O objetivo deste trabalho foi determinar as alterações bioquímicas provocadas pela aplicação de fertilizantes foliares isolados ou associados ao fungicida e a relação dessas modificações com o controle de *Puccinia triticina* em trigo. Dois experimentos foram conduzidos, um em casa de vegetação e outro em condições de campo, em 2014. Na casa de vegetação as plantas receberam tratamentos com fertilizantes foliares associados ou não ao fungicida em apenas uma aplicação. No campo, as plantas receberam os tratamentos com fertilizantes associados ao fungicida. Determinou-se a atividade da Guaiacol-Peroxidase, quantidade de peróxido de Hidrogênio H₂O₂, peroxidação lipídica, severidade de *Puccinia triticina* e parâmetros de produtividade. Na casa de vegetação, todos os tratamentos com aplicação de fertilizantes foliares reduziram a quantidade de H₂O₂ pela indução de atividade da enzima guaiacol-peroxidase. O fungicida isolado proporcionou maior estresse à planta, com maior acúmulo de H₂O₂. No campo e na casa de vegetação, os mesmos tratamentos de fertilizantes associados ao fungicida tiveram maiores controles da ferrugem da folha e maiores produtividades do que o tratamento apenas com fungicida, destacando os tratamentos com Double Act®, a base de Nitrogênio e Carbono, VittaSpray com vários elementos minerais, e também, o tratamento com Dithane NT®.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, guaiacol-peroxidase, peróxido de hidrogênio, nutrição mineral.

1 **ABSTRACT**

2
3 **Effects of nitrogens fertilizers in *Puccinia triticina*-*Triticum aestivum* pathosystem**

4
5 Abstract – The objective of this study was to determine the biochemical changes caused by applying
6 foliar fertilizers isolated or associated with the fungicide and the relationship of these changes with
7 *Puccinia triticina* control in wheat. Two experiments were conducted, one in greenhouse and other in
8 field conditions in 2014 year. In the greenhouse the plants were treatments with foliar fertilizers
9 associated or not with fungicide in one application. In the field, the plants received treatments with
10 fertilizers associated with fungicide. It was determined the activity of Guaiacol-peroxidase, hydrogen
11 peroxide quantity (H₂O₂), lipid peroxidation, severity of *Puccinia triticina* and productivity
12 parameters. In the greenhouse, all treatments with application of foliar fertilizers reduced the amount
13 of H₂O₂ by induction of guaiacol peroxidase activity. The isolated fungicide provided greater stress to
14 the plant, with higher accumulation of H₂O₂. In the field and greenhouse conditions, these same
15 treatments with fertilizer when combined with fungicide had higher leaf rust control and productivity
16 than treatment only fungicide, highlighting the treatment with foliar fertilizer Double Act®, with
17 nitrogen and carbon, VittaSpray®, with foliar fertilizer several mineral elements, and also, the
18 treatment with Dithane NT®.

19
20 Key words: *Triticum aestivum*, guaiacol-peroxidase, hydrogen peroxide, mineral nutrition;

INTRODUÇÃO

O cultivo do trigo (*Triticum aestivum*) é limitado tanto por fatores abióticos como bióticos, interferindo na produtividade de grãos do trigo em diversas regiões do mundo. Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas principalmente por *Puccinia triticina* Erikss (Ferrugem da folha), *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker (Mancha amarela) e *Blumeria graminis* (DC.) Speer (Oídio) são determinantes na redução da produtividade, que tem como causa biológica a redução da área foliar fotossinteticamente ativa da planta pela ocorrência da infecção e, como consequência, menor produção e mobilização dos produtos da fotossíntese para enchimento dos grãos. A aplicação de fungicidas é a principal maneira de controle das doenças foliares e de espiga, sendo rotineiramente empregada nas principais regiões agrícolas do mundo.

Porém, práticas de controle tomadas isoladamente não se mostram tão eficientes, como quando usadas conjuntamente. Como alternativas dentro do manejo integrado de doenças, temos a utilização de rotação cultural, eliminação de plantas voluntárias e hospedeiras secundárias, tratamento de sementes, aplicação de fungicidas na parte aérea e adubação equilibrada (TRIPATHI & DUBEY, 2004). Na busca por novas alternativas para controle desses fitopatógenos, a nutrição mineral integra-se às estratégias de controle, a qual além de promover a manutenção do equilíbrio nutricional da planta e, muitas vezes efeito sinérgico quando associados aos fungicidas, ainda pode atuar também na ativação de defesas contra os patógenos e trabalhar na redução do estresse oxidativo da planta promovido por todas as formas de estresse.

Quando a planta está sob efeito de estresse tanto biótico como abiótico, a primeira sinalização a nível celular para a ativação de respostas de defesa contra estresse é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEVINE et al., 1994; LOW; MÉRIDA, 1996), entre

1 as principais delas estão o oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, ânion superóxido O_2^- , peróxido de
2 hidrogênio H_2O_2 ou radical hidroxila OH^\cdot (CHANDRU et al., 2003) porém, quando em
3 quantidades mais elevadas causam severa injúria, decorrente da desintegração de clorofilas,
4 fragmentação do DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e, finalmente morte
5 celular (DODGE, 1994).

6 Na tentativa de evitar essa condição indesejável, o sistema de defesa enzimático das
7 plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares, que
8 podem promover a eliminação das ROS (HERNÁNDEZ et al., 2001). O grau do estresse
9 oxidativo em uma célula é determinado pela quantidade de superóxido, H_2O_2 e radicais
10 hidroxilas. Portanto, o balanço das atividades da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e
11 catalase são imprescindíveis na supressão dos níveis tóxicos das espécies reativas na célula
12 (APEL; HIRT, 2004). Além dessas, as peroxidases (PODs) também eliminam o H_2O_2
13 formado pela ação da SOD, pois o utiliza como oxidante e compostos de natureza fenólica
14 (ex. Guaiacol) como doadores de elétrons (LOCATO et al., 2010).

15 As PODs localizam-se principalmente na parede celular e no vacúolo das células. Sua
16 atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores
17 bióticos e abióticos, bem como na identificação precoce de processos morfogênicos durante a
18 diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas (LIMA et al., 2002; PIZA et al.,
19 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010).

20 Com isso, objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento bioquímico em plantas
21 de trigo submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes foliares nitrogenados associados ou
22 não com os ingredientes ativos Trifloxistrobina+Protioconazol e sua eficácia de controle sob
23 *Puccinia triticina*.

24

25

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1 – Casa de Vegetação

Local, instalação e condução das plantas

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na área experimental da Divisão de Pesquisa do Instituto Phytus, município de Itaara, região central do Rio Grande do Sul, localizado em latitude 29°35'8"S, longitude 53°48'28"O e altitude de 444m.

Vasos plásticos com volume de 5 L contendo substrato a base de solo + casca de arroz na proporção de 3:2 foram utilizados para condução das plantas. Por ocasião do preparo do substrato foi adicionado calcário Filler PRNT >90% na dose correspondente à 2000 Kg ha⁻¹ e fertilizante químico na fórmula NPK 8-28-18 na dose de 500 Kg ha⁻¹ por se tratar de adubação em vasos.

A semeadura ocorreu no dia vinte e nove de setembro de 2014, foram utilizadas sementes da cultivar de trigo Quartzo, tratadas com triadimenol (40,5 g i.a. 100 Kg⁻¹ de sementes) e imidacloprido + tiodicarbe (45,0 g i.a. + 135,0 g i.a. 100 Kg⁻¹ de sementes), produtos comerciais Baytan® (150 g/L) e Cropstar® (600 g/L), respectivamente. Foram semeadas 12 sementes por vaso para aplicação dos tratamentos. A irrigação foi por feita manualmente duas vezes por dia.

As adubações de Nitrogênio em cobertura foram realizadas em dois momentos. Aos 30 dias após a emergência (DAE), no estágio de perfilhamento e na alongação das plantas, aos 50 DAE, ambas as doses de 150 kg ha⁻¹ de uréia. Para cálculo da dose a ser aplicada considerou-se a área superficial do vaso, calculada a partir da medida do raio (r). No momento

1 de cada aplicação, as doses de ureia foram diluídas em respectivos 20 mL de água e fornecido
2 este volume para cada vaso.

3 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três
4 repetições, totalizando 12 tratamentos (Tabela 1). Os tratamentos foram aplicados no dia
5 26/11/14 com um pulverizador costal pressurizado à CO₂, dotado de barra de quatro pontas,
6 espaçadas em 50 cm, do tipo leque plano XR 110 02 e calibrado para uma vazão de 150 L ha⁻¹
7 ¹. Foi realizada apenas uma aplicação entre os estádio de emborrachamento e emissão da
8 espiga (estádio 49-51) (BBCH, 1997) (Anexo 1).

9 As plantas foram retiradas para fora da casa de vegetação para aplicação e após,
10 transportadas de volta. As condições ambientais no momento da aplicação fora da casa de
11 vegetação se encontram dispostas na Tabela 2.

12

13 **Tabela 1** – Tratamentos aplicados em plantas de trigo em condições de casa de vegetação.
14 Itaara/RS, 2014.

	Tratamentos	Composição	Dose (L/kg ha ⁻¹)
1	Testemunha		-
2	Fox®*	Protiocanazol+Trifloxistrobina	0,5
3	Fernit®	20% N + 22% S	3,0
4	Fox® +Fernit®*		0,5+3,0
5	VittaSpray®	N, P, K, Mg, Ca,S, B,Cu,Fe,Mn, Mo,Zn	0,5
6	Fox® + VittaSpray®*		0,5+0,5
7	Double Act®	8% N + 20% C	2,0
8	Fox® + Double Act®*		0,5+2,0
9	Fox® + Fernit® + VittaSpray®*		0,5+3,0+0,5
10	Fox® + Fernit® + Double Act®*		0,5+3,0+2,0
11	Dithane NT®	Mancozebe	2,5
12	Fox® + Dithane NT®*		0,5+2,5

15 * Os tratamentos com aplicação de fungicida foram adicionados de óleo vegetal Áureo na dose de 400 ml
16 ha⁻¹.

17

18

1 **Tabela 2**– Condições ambientais no momento da aplicação fora da casa de vegetação.

Data	Estágio	Temperatura	Umidade	Velocidade do Vento	Nebulosidade
26/11/14	37	28,3	55%	7,0 km.h ⁻¹	50%

2 Dados: Temperatura, umidade, velocidade do vento e radiação solar com base em termohigroanemometro.

3

4 A primeira coleta das folhas para análise bioquímica foi feita 24 horas após a
5 aplicação de cada tratamentos (27/11/2014), já a segunda coleta foi feita 120 horas após a
6 aplicação dos tratamentos (01/12/14). Em ambas coletas, foram retiradas as 3 folhas
7 superiores de um total de 2 a 3 plantas de cada repetição, compreendendo a amostra
8 composta.

9 As plantas foram inoculadas conforme DHINGRA & SINCLAIR (1995) com
10 urediniósporos de *Puccinia triticina* 48 horas após a aplicação dos tratamentos (28/11/14)
11 com pistola pressurizada a ar comprimido, sendo que a pulverização foi efetuada em ambas as
12 faces da folha até completo molhamento. O inóculo foi constituído por uma solução contendo
13 água, espalhante adesivo (Tween 80 - 100 ppm) e urediniósporos de *Puccinia triticina* na
14 concentração de 2×10^4 esporos.mL⁻¹.

15

16 **Avaliações**

17

18 **Quantificação da atividade da enzima Guaiacol Peroxidase**

19

20 A peroxidase (POD) constitui uma classe de enzimas que está extensamente
21 distribuída nos reinos animal e vegetal e pode ser facilmente extraída das células de alguns
22 vegetais. Esta enzima esta envolvida em muitos processos celulares, provavelmente devido ao
23 seu alto número de isoformas, funcionando com agente antioxidante, destoxificando o
24 peróxido de hidrogênio produzido em condições de estresse para a planta, como na

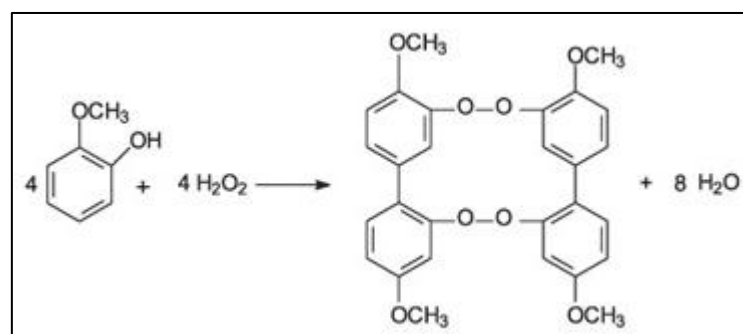
1 sinalização celular para expressão de genes que codifiquem para proteínas relacionadas com a
2 patogênese (PR-Proteínas), na formação de fitoalexinas e na polimerização de compostos da
3 parede celular, enrijecendo a mesma.

4 Amostras de folhas de trigo congeladas foram usadas para análise enzimática. Foram
5 pesadas 0,4 gramas de material vegetal de cada amostra e, estas, foram homogeneizadas em 3
6 mL de tampão Sódio Fosfato 0.05 M (pH 7.8) incluindo 1 mM EDTA e 1% Triton X-100. O
7 homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado para
8 os testes de atividade enzimática e proteína solúvel (ZHU et al., 2004).

9 Guaiacol Peroxidase (POD) foi mensurada de acordo com ZERAIK et al. (2008). A
10 mistura para reação continha 1.0 mL de tampão Fosfato Potássio a 100 mM (pH 6.5), 1.0 mL
11 de guaiacol (15 mM) e 1.0 mL de H₂O₂ (3 mM). Depois da homogeneização desta solução,
12 foi adicionado 50 µL de extrato da planta. A oxidação do guaiacol à tetraguaiacol foi
13 mensurada através do aumento na absorbância em 470 nm. Para o cálculo, foi usado o
14 coeficiente molar de extinção de 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹.

15 A atividade da peroxidase presente no extrato bruto foi determinada, como descrito,
16 utilizando-se o guaiacol como substrato. Este por sua vez, reage com o peróxido de
17 hidrogênio na presença da peroxidase formando o tetraguaiacol (Figura 1). Nesta reação, o
18 peróxido de hidrogênio é reduzido e o guaiacol, oxidado, atua como doador de prótons.

19



20

21

Esquema da reação na qual a enzima peroxidase converte o guaiacol e o peróxido de hidrogênio em tetraguaiacol.

1

2 **Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)**

3

4 As ROS são, sobretudo, subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem ser
5 gerados com a destruição do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresse,
6 tanto biótico (patógenos) como abiótico (fatores ambientais). Dentro das ROS, inclui-se o
7 peróxido de hidrogênio, sendo uma das espécies tóxicas mais importantes na sinalização
8 celular de estresse, o qual reage com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos,
9 podendo alterar suas funções.

10 O teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme descrito por
11 SERGIER, ALEXIEVA & KARONOV (1997). Para proceder-se essa análises, 0,1 g de
12 folhas foram maceradas com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2 mL de ácido
13 tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos. Para a
14 quantificação de H₂O₂, adicionaram-se alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante em 0,8 mL de
15 tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M. A solução foi deixada em
16 repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo a absorbância lida a 390 nm. A
17 concentração de H₂O₂ foi determinada através de curva padrão e expressa em mM g⁻¹.

18

19 **Peroxidação Lipídica (TBARS – Espécies reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico).**

20

21 Uma das formas de medir o dano às membranas é através das TBARS que é produto
22 da decomposição de ácidos graxos das biomembranas ocasionado pela peroxidação desses
23 lipídeos e, atesta a presença de radicais livres (MUNNÉ-BOSCH & ALEGRE, 2002). As
24 espécies reativas de oxigênio (ROS) são quimicamente agressivas e o ataque dos radicais
25 livres sobre os ácidos graxos polinsaturados componentes de lipídeos da membrana inicia a

1 peroxidação lipídica, um processo auto-catalítico que muda a estrutura e função da membrana
2 (SHAH et al., 2001), culminando no extravasamento do conteúdo celular e morte da célula.

3 O grau de peroxidação lipídica foi estimado seguindo metodologia proposta por EL-
4 MOSHATY et al. (1993). Amostras de folhas de trigo congeladas foram pesadas com
5 aproximadamente 0,2 g e homogeneizadas em 3 mL de tampão citrato-fosfato a 0.2 M (pH
6 6.5) contendo 0.5% Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado por 15 min a 20.000 g.
7 Um mililitro da fração sobrenadante foi adicionado à um volume igual a 20% (w/v) TCA
8 contendo 0.5% (w/v) de ácido tio barbitúrico (TBA). A mistura foi levada ao banho-maria por
9 40 min a 95°C e então rapidamente resfriado em banho de gelo por 15 min, e após,
10 centrifugado em 10,000 g por 15 min. A absorbância do sobrenadante em 532 nm foi lido e
11 corrigido para inespecífica turbidez por subtração do valor da absorbância a 600 nm. Os
12 peróxidos de lipídios foram expressados em $\mu\text{M g}^{-1}$ matéria fresca, pelo uso de um coeficiente
13 de extinção de $155 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

14

15 **Extração de Proteínas Solúveis**

16

17 A quantificação de proteínas solúveis no extrato da planta sinaliza para maior síntese
18 de enzimas antioxidantes, as quais são necessárias na desintoxicação da célula pelas ROS,
19 além disso, pode estar relacionada com a síntese de enzimas relacionadas com a patogênese
20 (Glucanases, quitinases, entre outras) e também, com proteínas estruturais da membrana
21 plasmática.

22 O teor de proteína solúvel foi determinado colorimetricamente pelo método descrito
23 por BRADFORD (1976). Para esta determinação, pipetou-se para tubos de ensaio, 200 μL do
24 extrato enzimático (mesmo sobrenadante usado para determinação da POD), acrescentou-se
25 2,0 mL do reagente "coomassie brilliant blue" (CBB), agitou-se suavemente cada tubo de

1 ensaio e procedeu-se as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm.
2 As leituras das amostras correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidos em
3 concentração de proteína solúvel, por comparação com as leituras de soluções padrões de
4 albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0, 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L. O
5 reagente CBB foi preparado dissolvendo-se 0,10 g de "coomassie brilliant blue" G-250 em 50
6 mL de álcool etílico absoluto, em seguida acrescentando-se 100 mL de ácido ortofosfórico
7 ($d=1,71 \text{ g.mL}^{-1}$) e 850 mL de água destilada.

8

9

10 **Análise estatística**

11

12 Os dados foram submetidos à análise dos pressupostos, e quando obedecidos
13 procedeu-se a análise da variância (ANOVA) e as diferenças significativas determinadas pelo
14 teste f. Quando significativo, as médias foram comparadas através do teste de Skott-Knott
15 ($p<0,05$), através do software Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2002).

16

17 **EXPERIMENTO 2 - Campo**

18

19 **Local, instalação e condução das plantas**

20

21 O experimento foi conduzido na Estação Experimental do Instituto Phytus, localizada
22 no município de Itaara, estado do Rio Grande do Sul, latitude de $29^{\circ}35'29,8''$ S, longitude
23 $53^{\circ}49'07,0''$ O e elevação de 439 m.

24 A implantação da cultura do trigo foi realizada sob sistema de semeadura direta em
25 sucessão a cultura da soja. Para preparo da área realizou-se dessecação com $2,5 \text{ L ha}^{-1}$ do

1 herbicida glifosato (480 g/L) e 2,0 L ha⁻¹ do herbicida Gramoxone® (200 g/L). A semeadura
 2 do trigo cultivar Quartzo foi realizada no dia 21 de junho de 2014, de forma mecanizada, com
 3 adubação de base de 300 Kg ha⁻¹ (fórmula 8-28-18), espaçamento entre linhas de 0,17 m com
 4 uma densidade de semeadura aproximada de 440 sementes m⁻², tratadas com Carboxina +
 5 Tiram (60 g i.a. + 60 g i.a. 100⁻¹ kg sementes) e Imidacloprido (35 g i.a. 100⁻¹ kg sementes),
 6 produtos comerciais Vitavax Thiram® e Gaucho®, respectivamente. A emergência se deu no
 7 dia três de julho de 2014 e estabeleceu-se uma população média de 300 plantas m⁻². As
 8 características químicas e físicas do solo no local do experimento são descritas na Tabela 3.

9

10 **Tabela 3** - Parâmetros químicos e físicos dos solos nos dois locais onde foram conduzidos os
 11 experimentos.

Parâmetros*	Itaara, RS
pH água 1:1	5,7
Ca (cmol_c/dm³)	6,0
Mg (cmol_c/dm³)	2,6
Al (cmol_c/dm³)	0,0
H+Al (cmol_c/dm³)	3,9
CTC efet. (cmol_c/dm³)	9,1
Saturação Al (%)	0,0
Saturação Bases (%)	70,3
Índice SMP	6,1
Matéria Orgânica (% - m/v)	3,5
Argila (% - m/v)	25,0
Textura	3,0
P-Mehlich (mg/dm³)	5,3
K (mg/dm³)	180,0

12 *Laboratório de Análises Química e Física do Solos – UFSM – Departamento de Solos. Vinculado à ROLAS –
 13 RS/SC

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

No experimento foi realizada adubação nitrogenada utilizando 250 Kg ha⁻¹ de uréia (46-00-00) aplicado em dois momentos: 125 Kg ha⁻¹ no perfilhamento e 125 Kg ha⁻¹ na alongação. Com exceção da aplicação de fungicidas para controle químico de doenças, os demais tratos culturais para manutenção do potencial produtivo da cultura foram realizados conforme Informações Técnicas para a Cultura do Trigo (Informações..., 2013). O acompanhamento dos principais estádios fenológicos das plantas foi baseado na escala fenológica dos cereais BBCH (1974) (Anexo 1).

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com cinco repetições, totalizando oito tratamentos (Tabela 4). Os tratamentos foram aplicados no dia 08/08/2014, 28/08/2014 e 26/09/2014, compreendendo os estádios de início do alongamento, final do alongamento e enchimento de grãos respectivamente, com intervalo de 20 dias entre a primeira e a segunda e 28 dias da segunda para a terceira em virtude de condições climáticas desfavoráveis à aplicação. A aplicação foi realizada com um pulverizador costal pressurizado à CO₂, dotado de barra de quatro pontas, espaçadas em 50 cm, do tipo leque plano XR 110 02 e calibrado para uma vazão de 150 L ha⁻¹.

As condições ambientais no momento da aplicação dos tratamentos no campo se encontram dispostas na Tabela 5.

1 **Tabela 4** – Tratamentos aplicados na cultivar de trigo Quartzo em condições de campo, Safra
 2 2014. Itaara, RS.

	TRATAMENTOS	Doses Dose (L/kg ha ⁻¹)
1	Testemunha	-
2	Fox® {Protioconazol + Trifloxistrobina}*	0,5
3	Fox® + Fernit® {20%N +22%S}*	0,5 + 3,0
4	Fox® + VitaSpray®{N, P, K, Mg, Ca,S, B,Cu,Fe,Mn, Mo,Zn}*	0,5 + 0,5
5	Fox® + Double Act® (8%N+20%C)*	0,5 + 2
6	Fox® + Fernit® + VittaSpray®*	0,5 + 3,0 + 0,5
7	Fox® + Fernit® + Double Act®*	0,5 + 3,0 + 2
8	Fox® + Dithane NT®*	0,5 + 2,5

3 * Os tratamentos com aplicação de fungicida foram adicionados de óleo vegetal Áureo na dose de 400 ml ha⁻¹.
 4

5 **Tabela 5** – Condições meteorológicas nas aplicações dos tratamentos sob a cultivar Quartzo,
 6 Safra 2014. Itaara, RS.

Aplicações	Data	Hora	UR	Temperatura	Vel. Vento
1 ^a	08/08/2014	17:38	58,6	15,0	4,5
2 ^a	28/08/2014	14:20	46,0	20,1	2,8
3 ^a	26/09/2014	14:25	55,0	28,0	4,4

7 Dados: Temperatura, umidade, velocidade do vento e radiação solar com base em termohigroanemometro.
 8

9 Avaliações

10

11 Severidade de *Puccinia triticina*

12

13 A severidade de ferrugem da folha foi avaliada mediante determinação do percentual
 14 de área foliar com sintomas da doença. Tal avaliação foi realizada visualmente em cada
 15 parcela e representou a média percentual de tecido com sintomas de todas as plantas
 16 analisadas. Tais avaliações foram realizadas aos sete, 14, 21 dias entre as aplicações e sete e
 17 14 dias após a última aplicação.

1 As notas de severidade serviram para o cálculo da área abaixo da curva de progresso
2 da doença (AACPD) (CAMPBELL & MADDEN, 1990). Através do qual, permite uma
3 avaliação mais estável da doença, sendo menos afetado pelo tempo de análise e variações
4 ambientais.

$$AACPD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [Y_{i+1} + Y_i] \times 0,5 \times (T_{i+1} - T_i)$$

5

6 Sendo:

7 Y_i : severidade da doença na época de avaliação i ($i=1, \dots, n$)

8 Y_{i+1} : severidade da doença na época de avaliação $i + 1$

9 T_i : época de avaliação i

10 T_{i+1} : época da avaliação $i + 1$

11 $n = n^\circ$ de observações

12

13 **Produtividade**

14

15 Produtividade dos tratamentos a partir da colheita das 10 linhas centrais de cada
16 parcela, espaçadas de 0,17 metros, e descartando meio metro das duas extremidades,
17 totalizando 6,8 m² de parcela útil colhida. As plantas foram colhidas e trilhadas
18 mecanicamente através de colhedora de parcela Semina 1400. Os grãos obtidos a partir da
19 colheita foram pesados e determinado a umidade em medidor eletrônico. A umidade foi então
20 convertida para 13% e o rendimento final expresso em kg ha⁻¹.

21

22

23

1 **Massa de mil grãos**

2

3 Este parâmetro foi determinado a partir do peso de cem grãos, obtido através de
4 contador eletrônico e balança Mediza®, de três sub-amostras de cada repetição. A massa de
5 mil grãos foi determinada através das médias por repetição, corrigindo-se o valor para a
6 umidade de 13% e multiplicando por 10.

7

8 **Peso do Hectolitro**

9

10 É a massa de 100 litros de trigo, expressa em quilogramas. É utilizado como medida
11 tradicional de comercialização em vários países e expressa indiretamente atributos de
12 qualidade de grãos, em especial dos relacionados com a moagem. O peso hectolitro foi obtido
13 através de uma amostra de grãos limpa de cada repetição a campo e processada em uma
14 balança de peso específico da marca Dallemolle®.

15

16 **Análise Estatística**

17

18 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de
19 comparação múltipla de médias de Skott-Knott a 5% de significância, utilizando o pacote
20 estatístico Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2002).

21

22

23

24

25

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos no experimento 1, pode-se verificar redução significativa do estresse oxidativo extremo das células da planta após a aplicação dos tratamentos com os fertilizantes foliares, pela destoxificação do excesso de peróxido de hidrogênio. Este resultado poderia explicar, em parte, o maior controle sob *Puccinia triticina* e maior produtividade nos tratamentos com aplicação, principalmente, onde utilizou-se o VittaSpray®, Double Act® e Dithane NT® no experimento 2.

A condição de estresse por temperatura alta nas plantas, apesar de ter sido um fator indesejável na condução do experimento, pode nos remeter a algumas inferências. No estresse abiótico por temperatura elevada, uns dos principais sinalizadores da condição de estresse é a produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio e no estresse biótico, pela infecção por algum patógeno é também sinalizada pelo peróxido de hidrogênio (VARNOVA et al., 2002). MALLICK & RAI (1999) concluíram que a produção de ROS em plantas é favorecida por vários fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos.

Nesse sentido, ambas as condições de estresse, tanto na casa de vegetação quanto no campo podem ser correlacionadas. Então, a condição de estresse oxidativo alta na testemunha cultivada em casa de vegetação ($19 \text{ mM H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ Massa Fresca) (Figura 4) reflete a condição da testemunha a campo com estresse oxidativo severo pelo processo infeccioso de *Puccinia triticina* (Tabela 6 e Figura 5). Segundo MITTLER (2002) sob condições adequadas de desenvolvimento, a produção de EROS na célula é baixa ($240 \text{ mM s}^{-1} \text{ O}_2^-$ e um nível "steady-state" de $0,5 \text{ mM s}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ nos cloroplastos), enquanto muitos estresses que alteram a

1 homeostase celular acentuam a sua produção (240 a 720 mM s⁻¹ O₂⁻ e 5 a 15 mM de H₂O₂).
2 Segundo TAROUCO (2014) o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) no trigo
3 dentro das temperaturas avaliadas, poderia indicar que as plantas sob estresse térmico
4 possuem maior capacidade de eliminação do radical superóxido (O₂⁻) através do aumento da
5 atividade da SOD, significando possível envolvimento desta enzima na tolerância ao calor
6 pelas plantas, e com isso, maior acúmulo de H₂O₂.

7 A quantificação da enzima Guaiacol-Peroxidase (Figura 2) mostra que não houve
8 grande indução da mesma com a aplicação dos tratamentos, com exceção dos tratamentos
9 com Fox® e Fox®+Fernit® os quais tiveram os maiores picos. Porém, a maior detecção
10 nesses tratamentos não levou a redução do estresse oxidativo, pois não foram eficientes na
11 remoção do excesso de H₂O₂ (Figura 4). O maior estresse oxidativo da planta nesses
12 tratamentos pode estar aliado à piora de controle de *Puccinia triticina* no campo (Tabela 6 e
13 Figura 5), pois a planta estava severamente infectada e com estresse oxidativo alto, e esses
14 tratamentos podem ter acentuado a explosão oxidativa.

15 Pôde-se observar, também, que o tratamento com Double Act® proporcionou maior
16 indução da Guaiacol-Peroxidase e esta condição está diretamente relacionada com a forte
17 redução na quantidade de H₂O₂. Além da Guaiacol-Peroxidase detectada neste trabalho,
18 provavelmente este tratamento induziu a ativação da Ascorbato-Peroxidase e Catalase
19 (BHATT & TRIPATHI, 2011), ambas importantes enzimas destoxicadoras. Já os
20 tratamentos com VittaSpray®, misturas triplas e Dithane NT® tiveram baixa detecção da
21 Guaiacol-Peroxidase, podendo estar mais diretamente relacionados como co-fatores metálicos
22 para funcionamento das isoformas da Superóxido Dismutase (SOD) (GILL & TUTEJA,
23 2010) que estão presentes na matriz mitocondrial, citosol e estroma do cloroplasto, e estas por
24 sua vez, dismutam o radical superóxido em H₂O₂. Mas, assim como no tratamento com
25 Double Act®, esses podem ter induzido a outras enzimas antioxidantes.

1 Pode-se inferir também, que Fernit® e VittaSpray® possuem indução da atividade da
2 Guaiacol-Peroxidase mais rápida, quando associados ao fungicida, do que o Double Act® e
3 Dithane NT® quando associados, porém, esses dois últimos foram mais eficientes na remoção
4 de H₂O₂ (Figura 2 e Figura 4). A forma diferenciada com que cada fertilizante foliar utilizado
5 responde em relação ao seu uso isolado ou em associação com o fungicida, se deve ao fato de
6 que cada fertilizante é composto por diferentes componentes, cada um tendo um papel
7 diferente dentro do metabolismo da planta, e cada fungicida possui ingredientes ativos que
8 reagem de forma diferente em determinadas caldas, modificando assim, a eficácia de seus
9 componentes, tanto por efeito aditivo, antagônico ou sinérgico (COLBY, 1967).

10 Mesmo sendo menores as concentrações de H₂O₂ proporcionadas pela indução do
11 complexo antioxidante na célula devido às aplicações dos tratamentos com fertilizantes
12 foliares, além de evitar a degradação de membranas e retorno do equilíbrio redox da célula,
13 ainda assim, podem inibir o crescimento de fungos e bactérias. Esse fato foi verificado por
14 WU et al. (1995) onde a concentração de 0,1 mM inibiu completamente o crescimento de
15 *Erwinia carotovora ssp. carotovora* (Jones) Bergey, Harrison, Breed, Hammer & Huntoon e
16 mais de 95% do crescimento de *Phytophthora infestans*.

17 Entre os dois períodos de coleta pode-se observar que o teor de proteína solúvel
18 aumentou em 13,2%, sendo na média 7,92 e 8,97 mg de proteína mL⁻¹, respectivamente para
19 primeira e segunda coleta (Figura 1). Isso indica que os tratamentos, aos cinco dias após a
20 aplicação, ainda estão induzindo à síntese de proteínas na planta, essas por sua vez, poderão
21 ser direcionadas para composição da parede celular, as quais juntamente com complexos de
22 lignina são mais resistentes à hidrólise ácida do que complexos com carboidratos (LIN &
23 KOLATTUKUDY, 1978) e síntese de enzimas peroxidases.

24 Entre os tratamentos, pode-se observar que todos proporcionaram maiores teores de
25 proteína com relação ao valor bruto na primeira e segunda coleta, mas só diferenciaram da

1 testemunha os tratamentos com VittaSpray®, Double Act® e Dithane NT® isolados e
2 associados aos ingredientes ativos Prothioconazol+Trifloxistrobina, e os tratamentos com
3 mistura tripla (Figura 1). O tratamento com Double Act® foi o que apresentou maior
4 conteúdo de proteína em ambas as coletas, visto que é composto por nitrogênio e carbono, e
5 ambos são integrantes da estrutura das proteínas.

6 Nitrogênio aplicado na antese aumentou o conteúdo de proteína em vários
7 experimentos conduzidos com trigo (GOODING & DAVIES, 1992; BLY & WOODARD,
8 2003), porque é rapidamente absorvido e particionado para o grão. NIMJI & GANDHI (1993)
9 e HUSSAIN et al. (1999) também reportaram que o conteúdo de proteína nos grãos aumenta
10 em maior proporção com a aplicação de nitrogênio via foliar comparado à aplicação do
11 mesmo no solo.

12 O maior incremento da detecção de proteínas solúveis na segunda coleta pode ter
13 refletido diretamente em maior atividade da Guaiacol-Peroxidase para alguns tratamentos, já
14 que as enzimas são proteínas, embora para outros o valor deste parâmetro tenha reduzido
15 (tratamentos com Dithane NT® e misturas triplas) (Figura 2). Esta redução, como comentado
16 anteriormente, deve-se ao fato de que essas proteínas podem ter sido direcionadas para síntese
17 de outras enzimas, que não a guaiacol-peroxidase, como a catalase (CAT) e ascorbato-
18 peroxidase (APX), pois estas são as duas enzimas mais importantes dentre os componentes de
19 desintoxicação do H₂O₂ (BHATT & TRIPATHI, 2011), visto que a quantidade de H₂O₂
20 detectado na segunda coleta foi consideravelmente menor para estes tratamentos, ao contrário
21 da aplicação com fungicida isolado e quando associado ao Fernit®.

22 A grande quantidade de H₂O₂ nas plantas no tratamento testemunha não levou à
23 proporcional degradação das membranas celulares (Figura 3). VERMA & DUBEY (2003)
24 também verificaram valores semelhantes de peroxidação lipídica no tratamento controle em
25 arroz. Esse fato levanta a hipótese de que estes produtos tóxicos podem ter sido armazenados

1 em algumas organelas celulares, provavelmente em vacúolos, os quais podem armazenar
2 substâncias potencialmente tóxicas, pois possuem interior ácido e enzimas digestórias que
3 efetuam a digestão intracelular, além disso, ainda estas substâncias podem ser inativadas
4 originando subprodutos não tóxicos a planta.

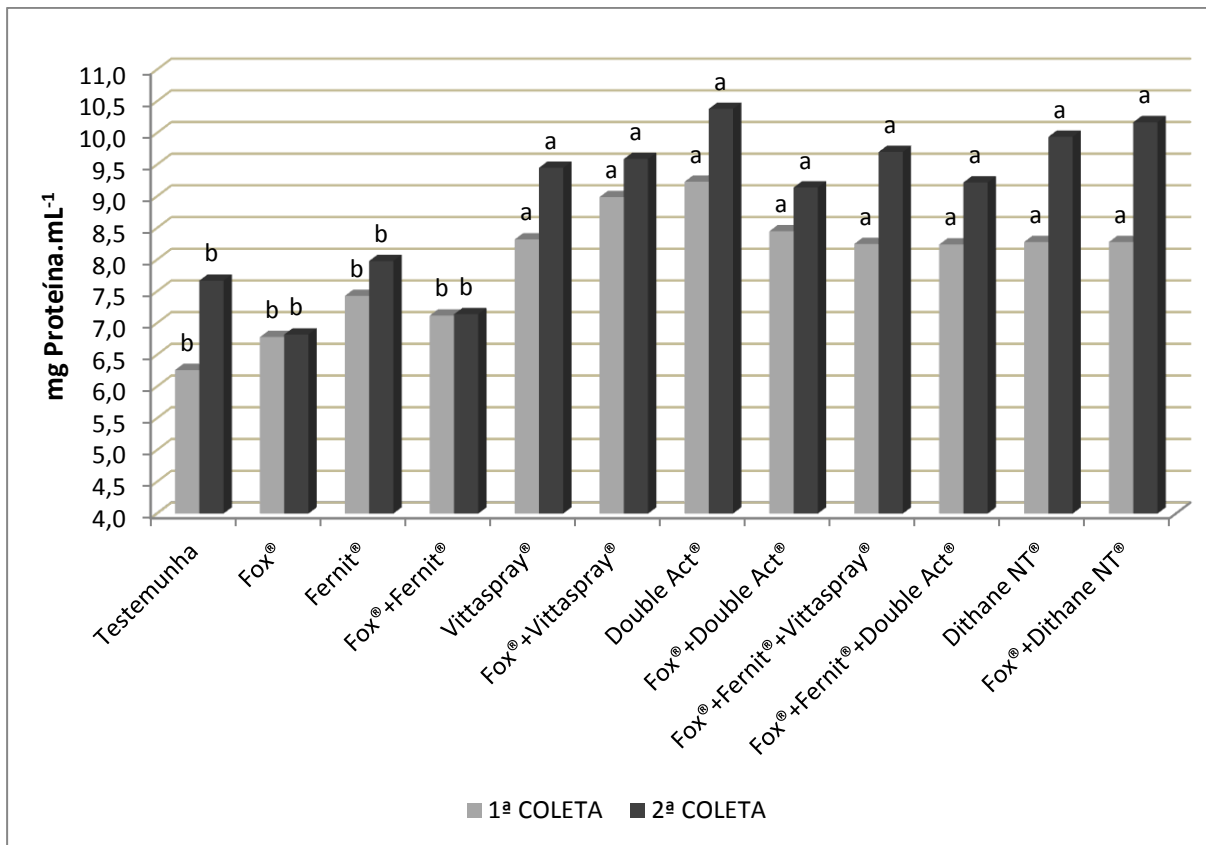
5 Após a aplicação dos tratamentos, a maioria dos tratamentos teve alguma atividade da
6 enzima Guaiacol-Peroxidase (Figura 2) e conseqüentemente, redução do H₂O₂ (Figura 4), por
7 isso praticamente não houve peroxidação lipídica que diferenciasse da testemunha não
8 tratada. A degradação das membranas celulares não é ocasionada apenas por peróxido de
9 hidrogênio H₂O₂, mas também por oxigênio singlete ¹O₂ (TRIANAPHYLIDES &
10 HAVAUX, 2009), ânion superóxido O₂⁻ (BREUSEGEM et al., 2001), e radicais hidroxila OH⁻
11 (BLOKHINA et al., 2003; BARREIROS & DAVID, 2006), e por isso a maior detecção de
12 espécies reativas ao ácido Tio-Barbitúrico (Figura 3) em alguns tratamentos, pode não ser
13 pelo peróxido de hidrogênio, mas sim, por essas outras formas tóxicas às membranas
14 celulares, as quais não foram determinadas neste trabalho.

15 Nos tratamentos com VittaSpray®, o mesmo é composto, entre vários elementos, por
16 Ferro e Cobre, os quais são elementos que fazem parte da primeira fase da peroxidação
17 lipídica, a iniciação, pois esses elementos podem formar um complexo de oxigênio ativo ou
18 como catalisador na decomposição de hidroperóxidos existentes (BHATTACHRJEE, 2005).
19 O Fernet®, por ter o enxofre (S) na sua composição, além de ter uma das maiores quantidades
20 de peróxido de hidrogênio, ainda provocou maior peroxidação lipídica. Resultado semelhante
21 foi encontrado por LI & YI (2012), onde houve maior produção de peróxido de hidrogênio e
22 ânion superóxido quando plantas de *Arabidopsis thaliana* foram tratadas com dióxido de
23 enxofre, e isso levou a maior peroxidação lipídica também.

24

25

1

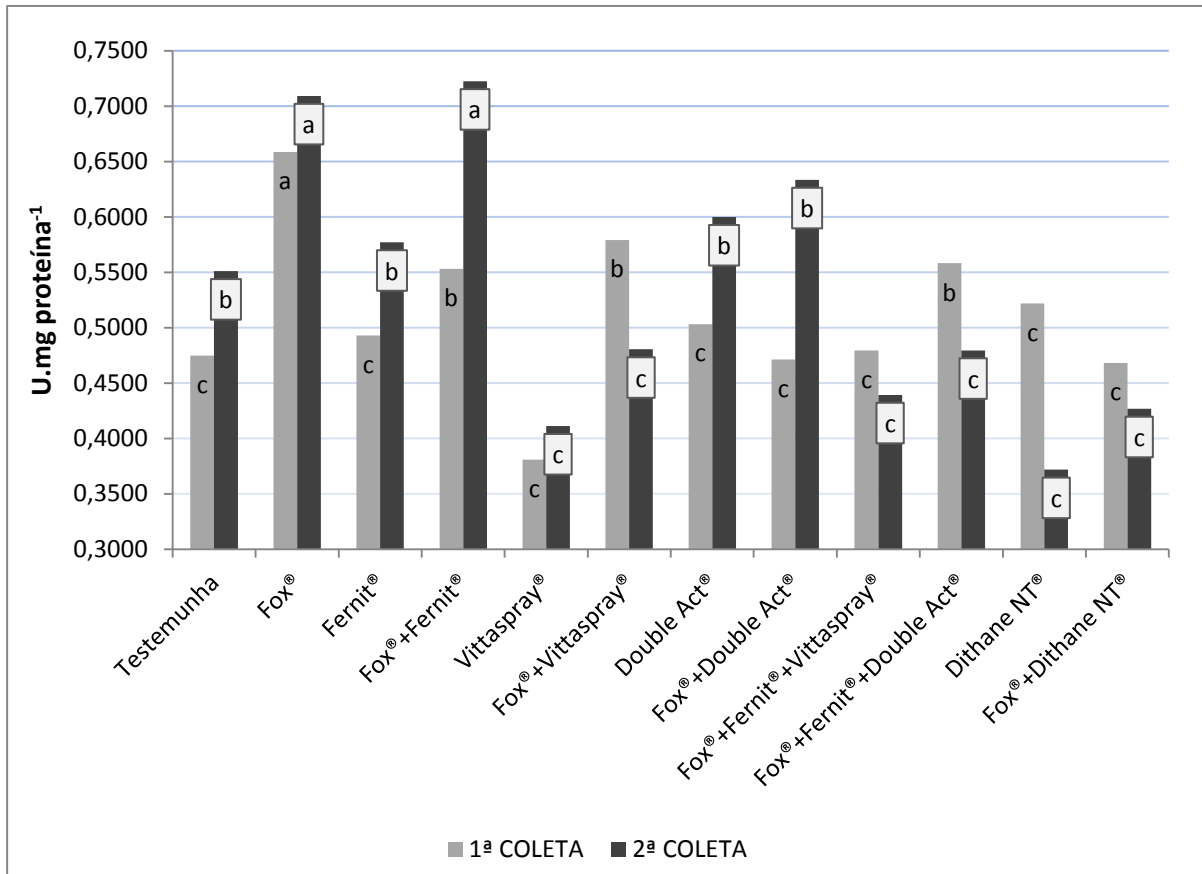


2

3 **Figura 1** – Quantificação de Proteínas Solúveis 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta)
4 após aplicação dos tratamentos. CV% 1ª Coleta = 7,78, CV% 2ª Coleta = 8,45. As médias
5 seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao
6 nível de 5% de probabilidade.

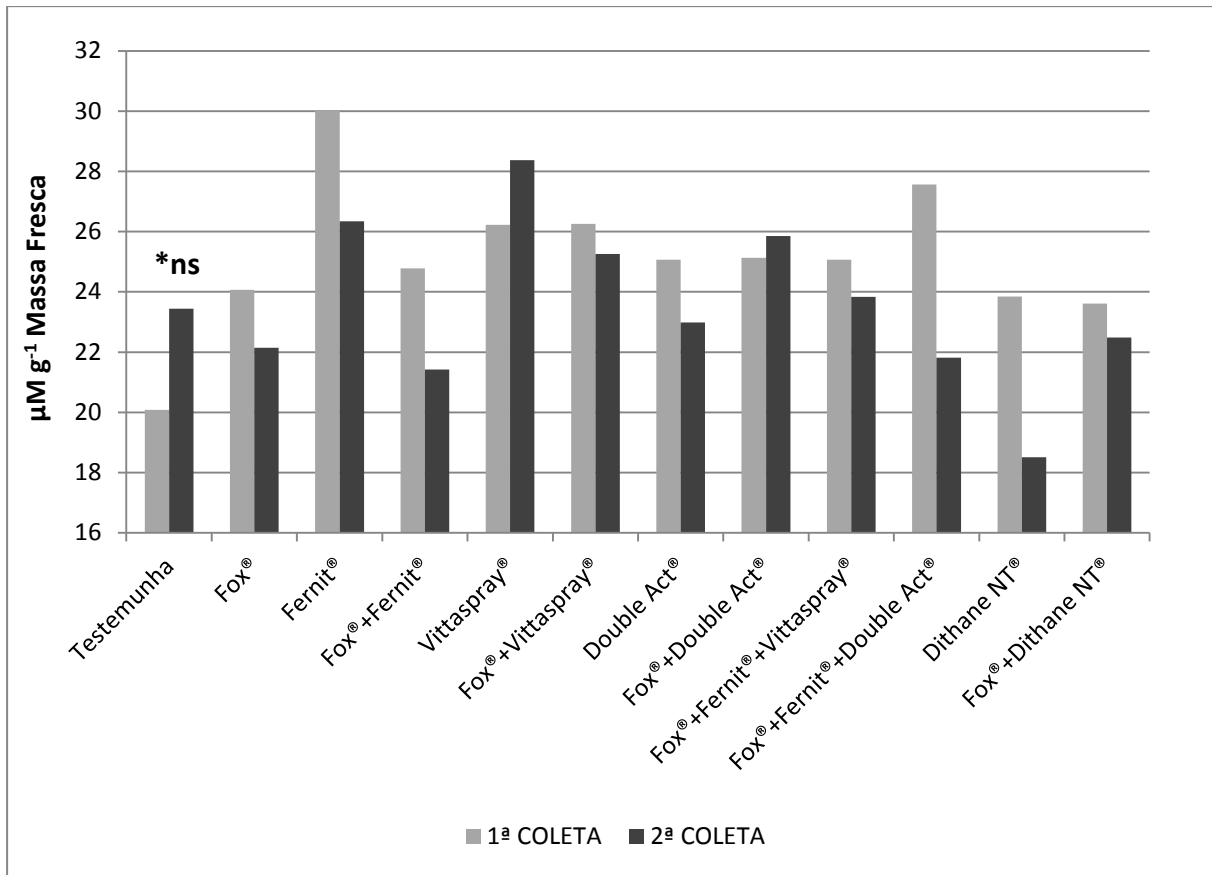
7

1

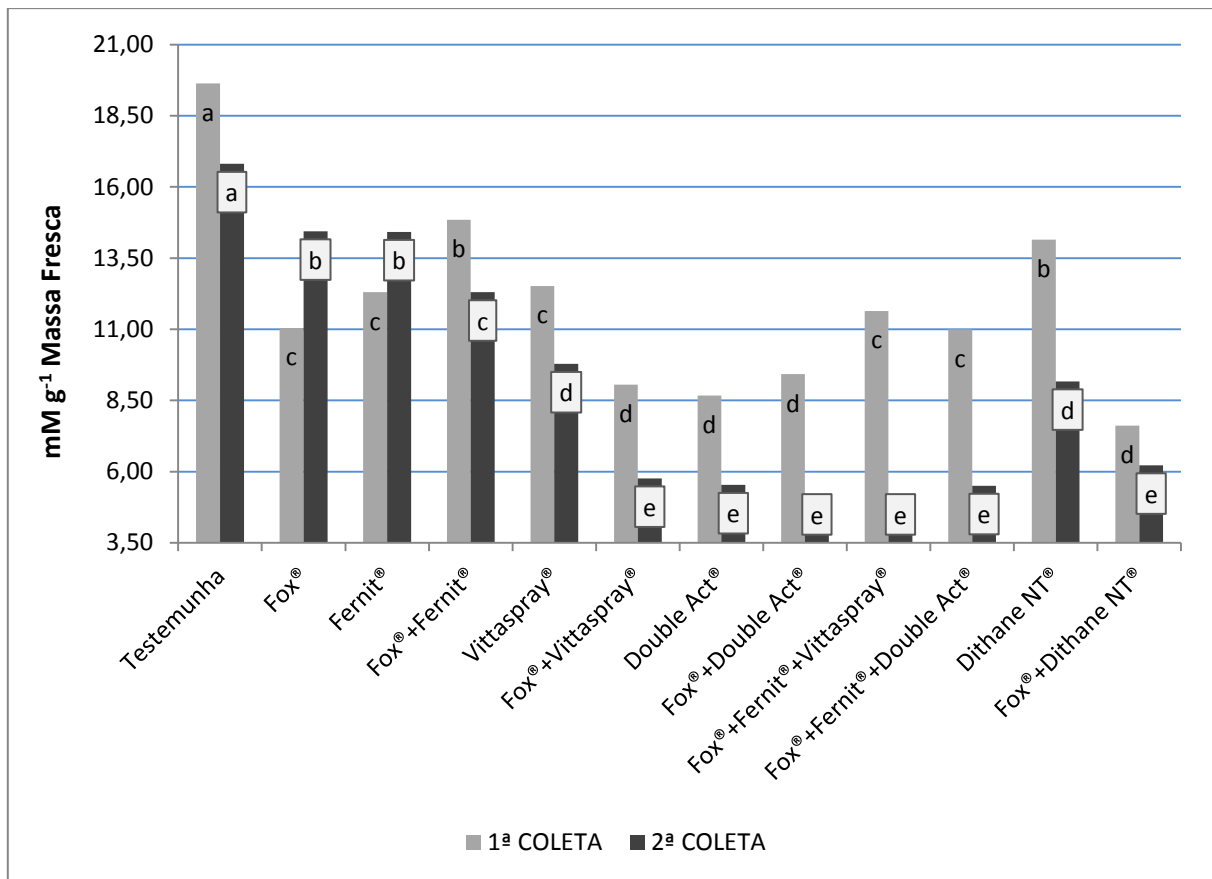


2
3
4
5
6
7
8

Figura 2 – Atividade da enzima Guaiacol-Peroxidase 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação dos tratamentos. CV% 1ª Coleta = 9,89, CV% 2ª Coleta = 11,85. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



1
 2 **Figura 3** – Peroxidação Lipídica 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª Coleta) após aplicação
 3 dos tratamentos. CV% 1ª Coleta = 10,05, CV% 2ª Coleta = 13,70. *ns – diferença entre os
 4 tratamentos não foi significativa pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.
 5
 6



1
 2 **Figura 4** – Quantificação de Peróxido de Hidrogênio 24 horas (1ª Coleta) e 120 horas (2ª
 3 Coleta) após aplicação dos tratamentos. CV% 1ª Coleta = 14,96, CV% 2ª Coleta = 8,44. As
 4 médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-
 5 Knott ao nível de 5% de probabilidade.

6
 7
 8 No experimento 2, observou-se que todos os tratamentos diferiram da testemunha na
 9 avaliação de severidade de *Puccinia triticina* e também no cálculo da AACP de ferrugem da
 10 folha trigo. Os tratamentos com aplicação de fungicida, associado ou não com fertilizantes
 11 foliares proporcionaram menor severidade da doença e acúmulo final da mesma (Tabela 6 e
 12 Figura 5). Esses resultados têm maior destaque para os tratamentos com adição do fertilizante
 13 foliar Double Act® {8%N + 20%C} e também, com a associação ao Dithane NT® {Mn},
 14 sendo que não houve diferença estatística significativa entre esses tratamentos, mas entre
 15 esses havendo em comparação ao tratamento com fungicida isolado, Fernit®, VittaSpray® e
 16 misturas triplas.

1 Associação sinérgica foi verificada por SAMOUCHA & GISI, (1987A, 1987B) e
2 EVENHUIS et al. (1996) entre Mancozebe e cimoxanil contra *Phytophthora infestans* e
3 *Plasmopara vitícola* e resultados similares também foram encontrados com BABA (DL-b-
4 ácido aminobutírico) e mancozebe no controle de *Phytophthora infestans* em batata e tomate
5 e *Pseudoperonospora cubensis* em pepino (BAIDER & COHEN, 2003). MARQUES (2014)
6 verificou associação sinérgica entre fungicida azoxistrobina + ciproconazol associado ao
7 fertilizante foliar Quantis®, composto por aminoácidos, com menores severidade e AACPD
8 de ferrugem e manchas foliares em trigo.

9 Os resultados obtidos no experimento 2 vão ao encontro com os obtidos no
10 experimento 1, no qual as alterações bioquímicas proporcionadas pelos tratamentos com
11 VittaSpray®, Double Act® e Dithane NT® associados com fungicida, reduzindo a toxicidade
12 do H₂O₂ produzido em resposta ao estresse térmico, o qual pode ser comparado ao estresse
13 pela infecção por *Puccinia triticina* no campo, já que ambos promovem as mesmas
14 sinalizações de defesa, explicado anteriormente. Essa redução na produção e acúmulo de
15 H₂O₂ ocorreu em virtude da ativação da Guaiacol-Peroxidase e, provavelmente das outras
16 enzimas antioxidantes Catalase e Ascorbato Peroxidase em relação à testemunha, ocorrendo
17 nestes casos, menor estresse oxidativo na planta, e com isso, proporcionando-a maiores
18 condições de mobilizar suas defesas para o combate à infecção por *Puccinia triticina*.

19 As peroxidases além de estarem relacionadas com o processo de proteção
20 antioxidativa catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de
21 hidrogênio, ainda têm estreita relação com o aumento na síntese de lignina que fortalece a
22 parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas em abundância por alguns
23 patógenos (KVARATSKHELIA et al., 1997), o que leva à resistência desta ao ataque de
24 patógenos. Esses dados corroboram com os encontrados por LIANG et al. (2005) onde
25 verificaram que plantas suplementadas com Si via solo reduziu os sintomas de oídio em

1 pepino, e este fato está associado com aumento na atividade das enzimas peroxidases,
2 polifenoloxidasas e quitinasas durante o processo infeccioso.

3 Resultados semelhantes foram observados em feijão-caupi, cv. 'Vita 3', tratado com
4 ácido salicílico (FERNANDES et al., 2006). Neste caso, uma isoforma aniônica da peroxidase
5 foi notadamente induzida após o tratamento com o ácido salicílico, sugerindo, assim, a
6 participação desta no mecanismo de defesa da planta. A indução da atividade de peroxidases,
7 pelo *acibenzolar-S-metil* (ASM), foi também relatada por CAVALCANTI (2000) em cacau
8 contra *Verticillium dahliae* Kleb., sendo detectada em um nível mais alto por período de
9 tempo mais longo. A atividade peroxidásica a partir da indução advém de uma seqüência de
10 eventos e sinais, partindo de uma isoforma pré-existente, catalizando o último passo
11 enzimático da biossíntese da lignina, servindo como barreira ao patógeno, ou mesmo
12 interagindo com a quitina da parede celular de muitos fungos atuando conjuntamente
13 com β 1,3-glucanase (FERNANDES, 1998). RODRIGUES et al. (2009), onde obtiveram
14 redução na severidade da ferrugem em plantas de soja pulverizadas com diferentes
15 concentrações de silicato de potássio. PEREIRA et al. (2009) aplicação foliar de KSi, na
16 tentativa de fornecer Si a soja, contribuiu para reduzir a severidade da ferrugem da soja.

17 Para efeito de produtividade, os tratamentos com fungicida associado ao VittaSpray®,
18 Double Act®, as misturas triplas e com Dithane NT® tiveram as maiores produtividades
19 (Figura 6), não diferindo entre si, mas diferenciando estatisticamente dos tratamentos com
20 fungicida isolado e fungicida associado ao Fernit®. Esses dois últimos, também diferiram
21 significativamente da testemunha. Em valores absolutos, fungicida com Double Act®
22 proporcionou o maior incremento, obtendo 100% de acréscimo em relação à testemunha neste
23 parâmetro (Figura 6). Esses dados corroboram com os encontrados por BLANDINO et al.
24 (2009), onde utilizaram fertilizante foliar a base de N, P e K associado com fungicidas do
25 grupo químico triazol e estrobilurina e isso proporcionou maior produtividade, peso de mil

1 grãos e proteína nos grãos. MAÇZYŃSKA et al. (2005) em trabalho com associação de
 2 fungicida e um policomposto fertilizante no controle de doenças em trigo concluiu que não
 3 houve redução de eficácia do fungicida e que além da melhor condição observada com plantas
 4 mais vigorosas e aumento da produção de grãos, destacou o aspecto econômico a partir da
 5 aplicação confinada de dois produtos em uma única aplicação.

6 Assim como para produtividade, os mesmos tratamentos comentados anteriormente,
 7 também conferiram maior peso de mil grãos, porém não diferiram estatisticamente dos outros
 8 dois tratamentos, fungicida isolado e associado ao Fernet® (Figura 6). No peso do hectolitro,
 9 todos os tratamentos com aplicação de produtos não diferiram estatisticamente da testemunha.
 10 Sendo o tratamento fungicida associado ao Double Act® o de maior PH em valores absolutos
 11 (Figura 7).

12

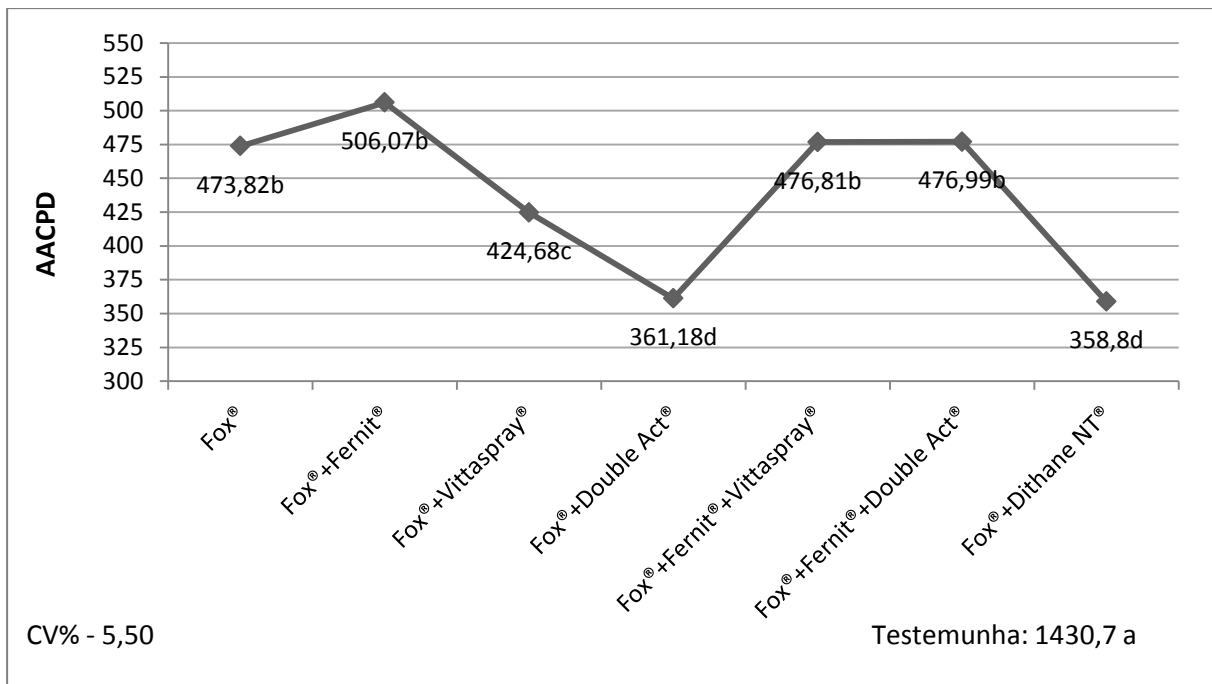
13 **Tabela 6** – Severidade de *Puccinia triticina* nos diferentes tratamentos aplicados na cultivar
 14 de trigo Quartzo. Itaara/RS. 2014.

TRATAMENTOS	14daa2	p<0,05	21daa2	p<0,05	7daa3	p<0,05	14da a3	p<0,05
Testemunha	19,1	a	35,2	a	60,8	a	71,0	a
Fox®	4,4	c	14,6	c	23,5	b	24,0	b
Fox®+Fernet®	4,9	b	15,5	b	24,8	b	25,3	b
Fox®+Vittaspray®	4,1	d	13,7	d	20,7	c	22,5	c
Fox®+Double Act®	3,8	d	10,5	e	17,6	d	18,3	d
Fox®+Fernet®+Vitta spray®	4,5	c	14,7	c	23,5	b	24,8	b
Fox®+Fernet®+Dou ble Act®	4,3	c	14,6	c	23,5	b	24,1	b
Fox®+Dithane NT®	3,8	d	10,6	e	17,6	d	18,6	d
CV		4,85		1,96		5,91		4,44

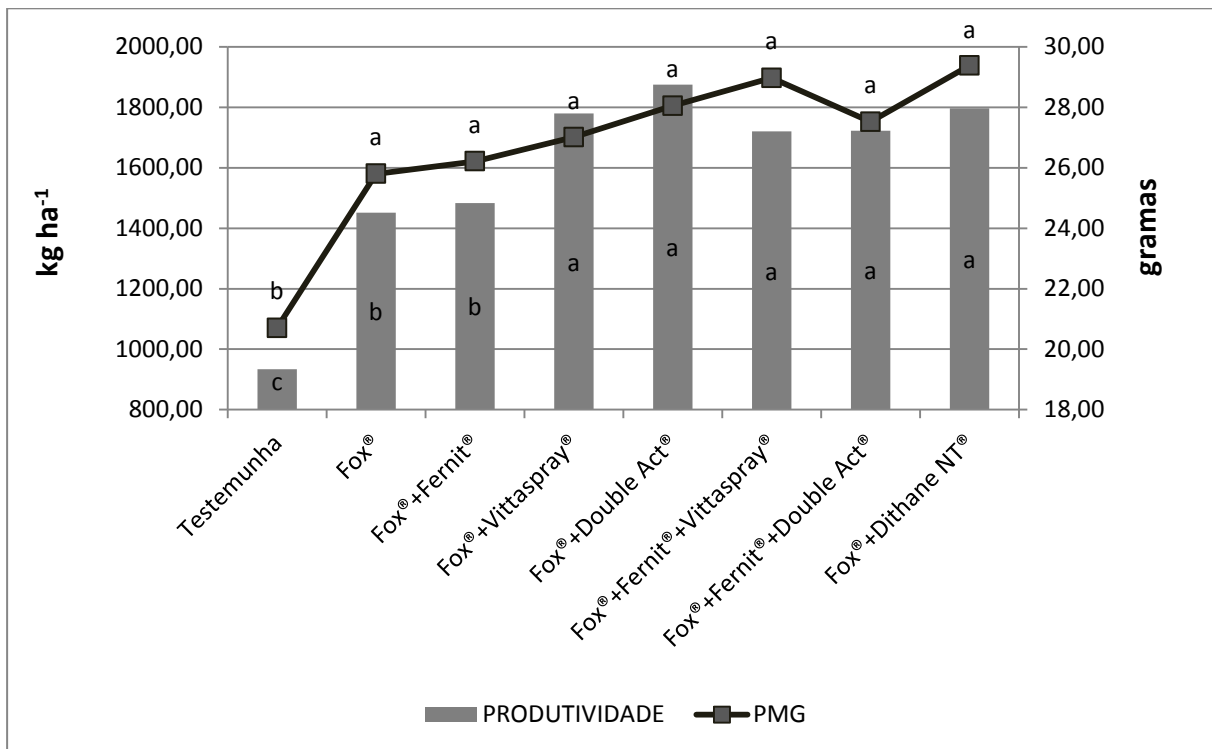
15 As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de
 16 5% de probabilidade.

17

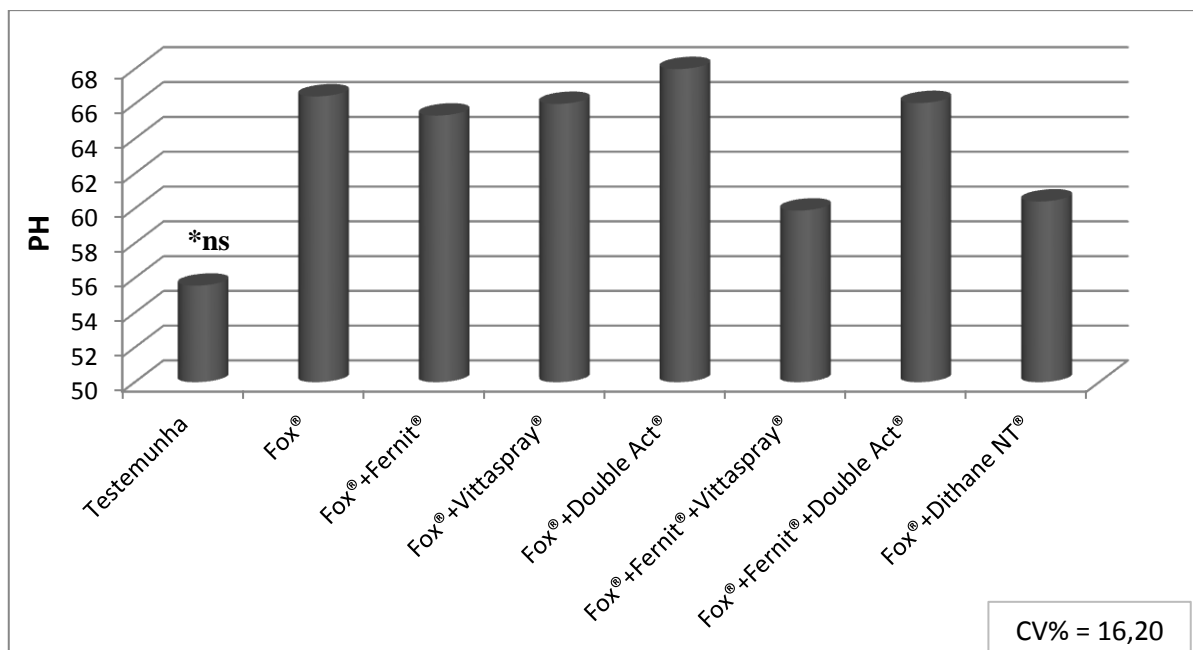
18



1
2 **Figura 5** – Área abaixo da curva de progresso de ferrugem da folha do trigo. Itaara/RS. 2014.
3 As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-
4 Knott ao nível de 5% de probabilidade.
5
6



7
8 **Figura 6** – Produtividade e Peso de mil grãos na cultivar Quartzo com diferentes tratamentos.
9 Itaara/RS. 2014. CV% Produtividade = 11,45, CV% PMG = 7,97 As médias seguidas pela
10 mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de
11 probabilidade.
12
13



1
 2 Figura 7 – Peso de Hectolitro na cultivar Quartzo com diferentes tratamentos. Itaara/RS.
 3 2014. *ns - as médias dos tratamentos não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de
 4 Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

7
 8 Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, a utilização dos
 9 fertilizantes foliares associado ao fungicida proporcionou menor estresse oxidativo para as
 10 plantas, principalmente pela grande redução na produção e acúmulo de peróxido de
 11 hidrogênio e, isso está relacionado com a indução de atividade da peroxidásica.

12 A indução da atividade peroxidásica nos tratamentos com fertilizantes foliares é
 13 indicativo da participação desta enzima no mecanismo de defesa do trigo contra o patógeno
 14 *Puccinia triticina* em condições de campo, refletindo em menor severidade desta, tendo maior
 15 produtividade, principalmente nos tratamentos com Vitta Spray®, Double Act® e Dithane
 16 NT®.

17 AGRADECIMENTOS

18
 19 À CAPES pelo auxílio financeiro concedido na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1
2
3
4 APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal
5 transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

6
7
8 BAIDER, A., COHEN, Y., 2003. Synergistic interaction between BABA and mancozeb in
9 controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis*
10 in cucumber. **Phytoparasitica** 31, 399-409.

11
12
13 BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies
14 reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006. Disponível em:
15 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021)
16 =S0100-40422006000100021>. Acesso em: 26 dez.. 2014. doi:10.1590/S0100-40422006000100021.

17
18
19 BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional
20 significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, p.850-859, 2011.
21 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000991>>.
22 Acesso em: 26 dez. 2014. doi 10.1016/j.bbr.2011.03.031.

23
24
25 BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress,
26 senescence and signal transduction in plant. **Current Science**, v.89, p.1113-1121, 2005.

27
28
29 BLANDINO, M., MINELLI, L., REYNERI, A. Strategies for the chemical control of
30 Fusarium head blight: effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol
31 contamination in winter wheat grain. **European Journal of Agronomy** 25, 193–201. 2006.
32 doi: [10.1016/j.eja.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.05.001)

33
34
35 BLOKHINA, O. et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a
36 review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003. Disponível em:
37 <<http://aob.oxfordjournals.org/content/91/2/179.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 Fev. 2012.
38 doi: 10.1093/aob/mcf118.

39
40
41 BLY, A.G.; WOODARD, H.J. 2003. Foliar nitrogen application timing influence on grain
42 yield and protein concentration of hard red winter and spring wheat. **Agron. J.** 95:335–338.

43
44
45 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
46 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**
47 72:248-254. 1976. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

1 BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen
2 species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.
3 [doi:10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6).
4
5
6 CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. Monitoring epidemics: diseases. In: _____.
7 **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. Cap.6, p.107-128.
8
9
10 CHANDRU, H.K.; KIM, E.; KUK, Y.; CHO K.; HAN, O. Kinetics of wound-induced
11 activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth
12 stages. **Plant Science**,v.164, p.935-941, 2003.
13
14
15 COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations.
16 **Weed Science**, Urbana 15 (1):20-22, 1967.
17
18
19 DHINGRA, O.D; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press,
20 1995. 434 p.
21
22
23 DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: **Causes of**
24 **Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants** (Foyer, C.H.;
25 Mulineaux, P.M. Eds.), p.219-236. CRC. Boca Raton. F.L., 1994.
26
27
28 EL-MOSHATY, F.I.B., PIKE, S.M., NOVACKY, A.J., SEHGAL, O.P. Lipid peroxidation
29 and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings
30 pot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.
31 43, p. 109 - 119, 1993. [doi:10.1006/pmpp.1993.1044](https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1044)
32
33
34 EVENHUIS et al. Synergy of cymoxanil and mancozeb when used to control potato late
35 blight. **Potato Res.** 39, 551-559. 1996
36
37
38 FERNANDES, C.F. **Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-**
39 **corda [*Vigna unguiculata*(L.) Walp.] cv. Vita 3**. (Dissertação de Mestrado). Fortaleza, CE.
40 Universidade Federal do Ceará. 1998.
41
42
43 FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.;
44 OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous
45 salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.
46 [doi:10.1016/j.jplph.2005.06.021](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.06.021)
47
48

1 GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress
2 tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.
3 Disponível: <http://www.plantstress.com/articles/up_oxidative_
4 [fi les/Antioxidants%20and%20stress%20tolerance%202010.pdf](http://www.plantstress.com/articles/up_oxidative_fi les/Antioxidants%20and%20stress%20tolerance%202010.pdf)>. Acesso em: 10 dez 2014.
5 doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
6
7
8 GOODING, M. J.; DAVIES, W. P. 1992. Foliar urea fertilization of cereals: A review.
9 **Fertilizer Research** 32: 209–222.
10
11
12 HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F.
13 Antioxidant Systems and O₂-/ H₂O₂ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation
14 with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. **Plant Physiology**, v.127, p. 827-831,
15 2001.
16
17
18 HUSSAIN, I. et al. Effect of nitrogen and sulfur on growth, yield and quality of hybrid maize.
19 **Pak. J. Bio. Sci.** 2(3): 637-638. 1999.
20
21
22 KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In:
23 GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science
24 Publishers, 2010. p.129-150.
25
26
27 KVARATSKHELIA M.; WINKEL, C; THORNELEY, R.N.F. Purification and
28 characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**
29 114:1237-1245. 1997. doi: [10.1104/pp.114.4.1237](https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1237)
30
31
32 LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB. C. H₂O₂ from the oxidative burst
33 orchestrates the plant hypersensitive response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.
34
35
36 LI, L; YI, H. Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant
37 enzyme activity in *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. Volume 58,
38 September 2012, Pages 46–53. doi:10.1016/j.plaphy.2012.06.009
39
40
41 LIANG Y.C.; SUN, W.C.; Si,J.; RÖMHELD, V. Effects of foliar and root applied silicon on
42 the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant**
43 **Pathology** 54:678-685. 2005. doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01246.x
44
45
46 LIMA, G.P.P. et al. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot*
47 *esculenta* Crantz CV ‘MCOL 22’) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8,
48 n.2, p.107-110, 2002. Disponível em:
49 <[http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v8n2/artigo04.](http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v8n2/artigo04.pdf)
50 pdf>

1
2
3 LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low
4 levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. **J. Bacteriol** 133:942-51. 1978
5
6
7 LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling
8 and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher**
9 **plants**. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.45-64.
10
11
12 LOW, P. S.; MÉRIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal
13 transduction. **Physiologia Plantarum**, v.96, p.533-542, 1996.
14
15
16 MAÇZYŃSKA, A.; GŁAZEK, M.; KRZYZIŃSKA, B. Effect of foliar fertilizer and
17 fungicidal protection against leaf spot diseases on winter wheat. **Acta Agrobotanica**, v.58,
18 n.1, p.51-58, 2005.
19
20
21 MARQUES, L. **Fertilizante foliar em associação com fungicida em trigo**. (Dissertação de
22 Mestrado). 2014. 122p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
23
24
25 MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in**
26 **Science**, v. 9, p. 405-410, 2002. doi:10.1016/S1360-1385(02)02312-9
27
28
29 MUNNÉ-BOSCH S; ALEGRE L. Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant
30 defences in chloroplasts of water-stressed Arabidopsis plants. **FEBS Lett.** 2002 Jul 31;524(1-
31 3):145-8.
32
33
34 NIMJI, P. M. AND GANDHI, A. P. 1993. Effect of maturity stage and fertilization on yield
35 and grain quality of sorghum (*Sorghum bicolor*). **Indian J. Agron.** 38(4): 562-568.
36
37
38 PIZA, I.M.T. et al. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro
39 micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n.4, p.361-366,
40 2003. Disponível em: <[http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v9n4/](http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v9n4/artigo09.pdf)
41 [artigo09.pdf](http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v9n4/artigo09.pdf)>.
42
43
44 RODRIGUES FA et al. Foliar application of potassium silicate on the control of soybean rust.
45 **Australasian Plant Pathology** 38:366-372. 2009. doi: 101071/AP09010
46
47
48 SAMOUCHA, Y., GISI, U., 1987a. Possible explanations of synergism in fungicide mixtures
49 against Phytophthom infestans. **Ann. Appl. Biol.** 110, 303-311. doi: 10.1111/j.1744-
50 7348.1987.tb03260.x

1
2
3 SAMOUCHA, Y., GISI, U., 1987B. Systemicity and persistence of cymoxanil in mixture
4 with oxadixyl and mancozeb against *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. **Crop**
5 **Prot.** 6, 393-398. doi:10.1016/0261-2194(87)90073-1
6

7
8 SERGIER, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect of spermine, atrazine and combination
9 between them on some endogenous protective systems and stress markers in plant. **Comptes**
10 **Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences**, v.51, p.121-124, 1997.
11

12
13 SHAH, K; KUMAR, R.G; VERMA, S; DUBEY, R.S. Effect of cádmium on lipid
14 peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing
15 rice seedlings, **Plant Sci.** 161 (2001) 1135_/1144.
16

17
18 SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o
19 sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1,
20 p.71-78, 2002. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev41/Art410.pdf>>. Acesso
21 em: 15 Nov. 2014.
22

23
24 TAROUCO, C.P. **Respostas morfofisiológicas à competição entre trigo e azevém e a**
25 **relação com nitrogênio, temperatura, luz e herbicidas. 2014. 163p.** Tese (Doutorado).
26 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
27

28
29 TRIANTAPHYLIDES, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production,
30 detoxification and signaling. **Trends in Plant Science**, v.14, n.4, p.219-229, 2009. Disponível
31 em: <<http://www.cell.com/trend/retrieve/pii/S1360138509000727>>. Acesso em: 23 Nov.
32 2014. doi:10.1016/j.tplants.2009.01.00.
33

34
35 TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to
36 control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and**
37 **Technology**, 32:235-245. 2004. doi: 10.1007/s00425-005-0160-5
38

39
40 VARNOVA, E. et al. Signal transduction during oxidative stress. **J. Exp. Bot.**, 2002, 53,
41 1227-1236.
42

43
44 VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of
45 antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 4, p. 645-655,
46 Apr. 2003. doi:10.1016/S0168-9452(03)00022-0
47
48

1 ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test
2 para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação.
3 **Química Nova** 31, 731-734. 2008.

4
5
6 ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J., QIAN, Q; YU, J. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases
7 antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant**
8 **Science** 167, 527–533. doi:10.1016/j.plantsci.2004.04.020

9
10
11 WU, Y.X.; TIEDEMANN, A.V. Impact of fungicides on active oxygen species and
12 antioxidante enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone.
13 **Environmental Pollution** 116 (2002) 37–47. doi:10.1016/S0269-7491(01)00174-9

ANEXOS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

ANEXO A - Escala fenológica BBCH para os cereais de inverno.

The extended BBCH-scale, for specific crops	
Cereals Witzemberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991 □	
Phenological growth stages and BBCH-identification keys of cereals (wheat = <i>Triticum</i> sp. L., barley = <i>Hordeum vulgare</i> L., oat = <i>Avena sativa</i> L., rye = <i>Secale cereale</i> L.)	
Code	Description
Principal growth stage 0: Germination	
00	Dry seed (caryopsis)
01	Beginning of seed imbibition
03	Seed imbibition complete
05	Radicle emerged from caryopsis
06	Radicle elongated, root hairs and/or side roots visible
07	Coleoptile emerged from caryopsis
09	Emergence: coleoptile penetrates soil surface (cracking stage)
Principal growth stage 1: Leaf development^{1, 2}	
10	First leaf through coleoptile
11	First leaf unfolded
12	2 leaves unfolded
13	3 leaves unfolded
1..	Stages continuous till ...
19	9 or more leaves unfolded
Principal growth stage 2: Tillering³	
20	No tillers
21	Beginning of tillering: first tiller detectable
22	2 tillers detectable
23	3 tillers detectable
2..	Stages continuous till ...
29	End of tillering. Maximum no. of tillers detectable

¹ A leaf is unfolded when its ligule is visible or the tip of the next leaf is visible
² Tillering or stem elongation may occur earlier than stage 13; in this case continue with stages 21
³ If stem elongation begins before the end of tillering continue with stage 30

Continua...

1 ANEXO A - Escala fenológica BBCH para os cereais de inverno.

Cereals Witzemberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991	
Phenological growth stages and BBCH-identification keys of cereals	
Code	Description
Principal growth stage 3: Stem elongation	
30	Beginning of stem elongation: pseudostem and tillers erect, first internode begins to elongate, top of inflorescence at least 1 cm above tillering node
31	First node at least 1 cm above tillering node
32	Node 2 at least 2 cm above node 1
33	Node 3 at least 2 cm above node 2
34	Stages continuous till ...
37	Flag leaf just visible, still rolled
39	Flag leaf stage: flag leaf fully unrolled, ligule just visible
Principal growth stage 4: Booting	
41	Early boot stage: flag leaf sheath extending
43	Mid boot stage: flag leaf sheath just visibly swollen
45	Late boot stage: flag leaf sheath swollen
47	Flag leaf sheath opening
49	First awns visible (in awned forms only)
Principal growth stage 5: Inflorescence emergence, heading	
51	Beginning of heading: tip of inflorescence emerged from sheath, first spikelet just visible
52	20% of inflorescence emerged
53	30% of inflorescence emerged
54	40% of inflorescence emerged
55	Middle of heading: half of inflorescence emerged
56	60% of inflorescence emerged
57	70% of inflorescence emerged
58	80% of inflorescence emerged
59	End of heading: inflorescence fully emerged
Principal growth stage 6: Flowering, anthesis	
61	Beginning of flowering: first anthers visible
65	Full flowering: 50% of anthers mature
69	End of flowering: all spikelets have completed flowering but some dehydrated anthers may remain
Principal growth stage 7: Development of fruit	
71	Watery ripe: first grains have reached half their final size
73	Early milk
75	Medium milk: grain content milky, grains reached final size, still green
77	Late milk

3 ...continuação....

4

5 ANEXO A - Escala fenológica BBCH para os cereais de inverno.

Cereals Witzemberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991	
Phenological growth stages and BBCH-identification keys of cereals	
Code	Description
Principal growth stage 8: Ripening	
83	Early dough
85	Soft dough: grain content soft but dry. Fingernail impression not held
87	Hard dough: grain content solid. Fingernail impression held
89	Fully ripe: grain hard, difficult to divide with thumbnail
Principal growth stage 9: Senescence	
92	Over-ripe: grain very hard, cannot be dented by thumbnail
93	Grains loosening in day-time
97	Plant dead and collapsing
99	Harvested product

6

7