

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

VINÍCIUS DE SOUZA RIOS

Avaliação da fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*.

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

VINÍCIUS DE SOUZA RIOS

Avaliação da fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*.

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: Trabalho
científico.**

Orientador: Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Coorientador: Dr. Jonas Alberto Rios

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

VINÍCIUS DE SOUZA RIOS

Avaliação da fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*.

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: trabalho
científico.**

APROVADO: 06 de junho de 2017.

Prof. Fabricio de Ávila Rodrigues
(Orientador)
(UFV)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida e não somente durante estes anos de UFV, mas em todos os momentos, sendo o maior mestre que alguém pode conhecer. Ao Prof. Fabricio de Ávila Rodrigues pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. A todos os estudantes do LIPP (Laboratório de interação Planta-Patógeno) que me ajudaram na execução deste trabalho. Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional oferecido e principalmente meu irmão Jonas pela amizade, conselhos e pelo grande incentivo durante todo este período.

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das principais doenças que afetam a produtividade desta cultura. O objetivo deste estudo foi investigar a eficiência fotossintética (analisada pelas alterações nas trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) e concentração de pigmentos fotossintéticos) em plantas de soja tratadas ou não tratadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e com o fungicida Epoxiconazole + Piraclostrobina (Epo + Pir) e posteriormente inoculadas com *P. pachyrhizi*. Os resultados demonstraram que plantas tratadas com ASM e, principalmente, Epo + Pir apresentaram menor severidade da doença quando comparado ao tratamento controle (pulverização de água). De modo geral, os valores associados aos parâmetros de trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*) e a taxa de transpiração (*E*) foram significativamente superiores em plantas infectadas tratadas com ASM e Epo + Pir em comparação com as plantas do tratamento de controle. Similarmente, os parâmetros de fluorescência da Chl *a*: dissipação da fluorescência máxima do fotossistema II (FSII) (*F_v/F_m*), fluorescência inicial (*F₀*) fluorescência máxima (*F_m*), fluorescência efetiva do FSII (*Y(II)*) e quantum de dissipação da energia regulada (*Y(NPQ)*) foram significativamente superiores em plantas tratadas com ASM e Epo + Pir. Por outro lado, os valores para o parâmetros do quantum de dissipação da energia não regulada (*Y (NO)*) foram significativamente menores para os tratamentos ASM e Epo + Pir. A concentrações de Chl *a* + *b* e carotenoides foram significativamente menores em plantas infectadas e tratadas com ASM e Epo + Pir. Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento de plantas de soja com ASM e, principalmente, Epo + Pir reduziram os efeitos negativos causados pela infecção por *P. pachyrhizi*, permitindo um melhor desempenho fotossintético dessas plantas.

Palavras-chave: *Phakopsora pachyrhizi*, fungicidas.

ABSTRACT

Asian soybean rust, caused by *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the most important foliar diseases affecting soybean production worldwide. This study aimed to investigate the photosynthetic performance (leaf gas exchange, chlorophyll (Chl) *a* fluorescence images and photosynthetic pigment pools) of soybean plants sprayed with Acibenzolar-S-Methyl (ASM) and with the fungicide Epoxiconazole + Pyraclostrobin (Epo + Pyr) and further inoculated with *P. pachyrhizi*. The ASR symptoms progressed much faster on the leaves of plants from the control treatment (water spray) in comparison to the ASM and Epo +Pyr treatments. In general, the values for the leaf gas exchange parameters net carbon assimilation rate, stomatal conductance to water vapor, internal CO₂ concentration and transpiration rate increased for the infected plants sprayed with ASM or Epo +Pyr in comparison to plants from the control treatment. The values for the parameters initial fluorescence, maximal fluorescence, maximal photosystem II quantum efficiency, effective photosystem II quantum yield (Y(II)) and quantum yield of regulated energy dissipation (Y(NPQ)) were consistently higher for the ASM and Epo +Pyr treatments in comparison to the control treatment at advanced stages of fungal infection. By contrast, the values for the parameter quantum yield of non-regulated energy dissipation (Y (NO)) were significantly lower for the ASM and Epo + Pyr treatments. The curves for Y (II) decreased while the curves for Y (NPQ) and Y (NO) increased for plants from the control, ASM and Epo + Pyr treatments as a function of the photosynthetic photon flux density. The concentrations of total Chl *a* + *b* and carotenoids significantly increased for the infected plants from the ASM and Epo + Pyr treatments in comparison to plants from the control treatment. In conclusion, the results of the present study demonstrated that the spray of either soybean plants with Epo + Pyr or ASM, but especially the former, contributed to reduce the negative effects caused by *P. pachyrhizi* infection and allowed a good photosynthetic performance of the infected plants.

Key words: *Phakopsora pachyrhizi*, fungicide

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Crescimento das plantas.....	9
2.2 Tratamentos, preparação do inóculo e inoculação das plantas	10
2.3 Avaliação da doença	10
2.4 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas	11
2.5 Análise da fluorescência da Chl <i>a</i>	11
2.6 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos.....	12
2.7 Delineamento experimental e análise estatística.....	12
3 RESULTADOS	12
3.1 Severidade da ferrugem asiática da soja, AACPD e NL	12
3.2 Parâmetros de trocas gasosas foliares	12
3.3 Análise da fluorescência da Chl <i>a</i>	13
3.4 Concentração de pigmentos	14
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	15
5 REFERÊNCIAS	19
FIGURAS	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, é responsável por perdas significativas na produtividade da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) nas principais regiões produtoras no Brasil (Sinclair & Hartman, 1999; Yorinori & Morel, 2002). Os sintomas da FAS são pequenas pústulas de coloração castanha a marrom escura observadas na face abaxial das folhas. As pústulas de FAS apresentam um formato angular, de 2 a 5 mm de diâmetro (Sinclair & Hartman, 1999). Em níveis avançados de severidade, esta doença pode apresentar lesões necróticas e desfolha precoce, comprometendo o rendimento e a qualidade dos grãos (Yang *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 2006). Adicionalmente, estes sintomas podem alterar negativamente o processo fotossintético das folhas e consequentemente a produtividade de grãos (Rodrigues *et al.*, 2009). De fato, as plantas que apresentam intensa desfolha apresentam um número reduzido de vagens por plantas, menor quantidade de grãos por vagem e menor peso dos grãos, principalmente quando a infecção por *P. pachyrhizi* ocorre nos estádios de pré-florescimento ou de enchimento de grãos (Ogle *et al.*, 1979; Bromfield, 1991). A indisponibilidade de cultivares comerciais com níveis aceitáveis de resistência a FAS e a alta variabilidade genética da população de *P. pachyrhizi* são as principais causas da ineficiência de controle desta doença (Reis *et al.*, 2006; Yamanaka *et al.*, 2010). O uso de fungicidas sistêmicos tem sido recomendado em regiões onde ocorrem frequentes epidemias de FAS (Reis *et al.*, 2006). No entanto, o uso de indutores de resistência, como o Acibenzolar-S-Metil (ASM), um análogo do ácido salicílico, poderia ser uma alternativa para o manejo da FAS (Dallagnol *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2013, 2014).

A fotossíntese é o principal processo fisiológico negativamente afetado por patógenos (Bastiaans, 1991; Bassanezi *et al.*, 2002; Dallagnol *et al.*, 2011). Assim, uma adequada determinação da fotossíntese em plantas infectadas por patógenos pode ser importante para esclarecimentos sobre os mecanismos associados durante a interação hospedeiro e o patógeno. Adicionalmente, poderia ajudar a estimar as perdas de produtividade das plantas infectadas e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle de doença (Bastiaans *et al.*, 1991; Bastiaans *et al.*, 1993; Rolfe & Scholes *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2012). Métodos não-invasivos como fluorescência de imagem da Chl *a*, particularmente quando combinadas as trocas gasosas, fornecem uma análise espaço-temporal detalhada das alterações no processo fotossintético de plantas devido a infecção por patógenos (Baker *et al.*, 2001; Rolfe & Scholes, 2010; Iqbal *et al.*, 2012; Rousseau *et al.*, 2013). Alterações nas trocas gasosas e no processo de dissipação da fluorescência da Chl *a* tem sido demonstrados para diferentes patossistemas (Petit

et al., 2006; Baker *et al.*, 2008; Petit *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Geralmente, as folhas infectadas exibem uma redução inicial no rendimento quântico FSII efetivo ($Y(II)$), um aumento no rendimento quântico de dissipação de energia regulada $Y(NO)$ e um declínio no rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m) (Scholes & Rolfe, 2009). Adicionalmente, a pulverização foliar de epoxiconazole sobre as plantas podem provocar alterações na biossíntese de ergosterol e perdas da integridade a nível de tilacóides proporcionando um atraso no crescimento destas plantas (Benton *et al.*, 1997). Por outro lado, as plantas pulverizadas com estrobirulinas apresentaram uma maior proporção de tecidos verdes fotossinteticamente ativos, altas concentrações foliares de nitrogênio, de pigmentos e de proteínas que contribuem para retardar o processo de senescência foliar e reforçar a regulação hormonal durante a produção de energia mitocondrial (Grossmann *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001; Bertelsen *et al.*, 2001; Bartlett *et al.*, 2002; Ruske *et al.*, 2003).

O presente estudo objetivou determinar a eficiência fotossintética (através da análise da fluorescência Chl *a*, trocas gasosas e concentração de pigmentos fotossintéticos) em plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi* tratadas ou não com ASM ou Epo + Pir. Portanto, os principais objetivos deste estudo foram: 1) determinar os efeitos da aplicação de fungicida 13,3 % de epoxiconazole + 5% de piraclostrobina e Acibenzolar-S-metil sobre a intensidade de FAS 2) utilizar a fluorescência da (Chl) *a* e análise de trocas gasosas para determinar o efeito da ferrugem da soja sobre o desempenho fotossintético destas plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Crescimento das plantas

As sementes de soja (cultivar Anta 82 RR) foram superficialmente esterilizadas em NaOCl (10 %) durante 2 minutos e semeadas em vasos de plástico (20 cm de diâmetro) (Ecovaso, Jaguariúna, São Paulo, Brasil), preenchidos com 2 kg de substrato constituído de uma mistura 1: 1: 1 de casca de pinheiro, turfa e vermiculita expandida (Tropstrato®, Vida Verde, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). Adicionou-se a cada vaso de plástico um total de 1,63 gramas de fosfato de cálcio monobásico. Foram semeados cinco sementes por vaso e cinco dias após a emergência das mudas, foi realizado um desbaste com permanência de três plântulas por vaso. Quinze dias após a semeadura, as plantas receberam 30 ml de solução nutritiva contendo 2,5 mM de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 1 mM de NH_4NO_3 ; 1 mM de KNO_3 ; 1 mM de KH_2PO_4 ; 1 mM de KCl; 1 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 H_3BO_3 ; 0,2 μM , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,2 μM , $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,2 μM de $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$; 0,2 μM de $Na_2EDTA \cdot H_2O$; 0,5 mM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Um total de 30

ml de solução nutritiva foi aplicada em cada vaso semanalmente. A solução nutritiva foi preparada utilizando água deionizada. As plantas foram mantidas na estufa durante os experimentos e foram irrigadas conforme necessário.

2.2 Tratamentos, preparação do inóculo e inoculação das plantas

Os tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle), Acibenzolar-S-Metil (ASM) (300 mg L⁻¹, Syngenta, São Paulo, Brasil) e aplicação do fungicida 13,3% Epoxiconazole + 5% Piraclostrobina (0,5 L ha⁻¹, Opera, Basf SA, São Paulo, Brasil). Estes produtos foram aplicados 48 horas antes da inoculação da planta utilizando um atomizador manual (aerógrafo - Paasche, Chicago, IL). Posteriormente, as plantas foram inoculadas no estádio de crescimento V6 (Caviness & Fehr, 1977) com uma suspensão de uredósporos, proveniente de um isolado de *P. pachyrhizi* (UFV-DFP Pp018), na concentração de 1×10^5 de uredósporos mL⁻¹. Os uredósporos de *P. pachyrhizi* foram previamente multiplicados em plantas do cultivar BR/MG 46 (Conquista). Vinte e cinco mililitros de suspensão foram pulverizados sob a forma de uma névoa fina sobre as folhas de cada planta até o ponto de escorrimento utilizando um atomizador manual. Na suspensão de esporos foi adicionada gelatina (1%) para auxiliar na adesão de uredósporos à superfície das folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento com uma temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ por um período de 24 horas no escuro. Após este período, as plantas foram transferidas para uma câmara de nevoeiro onde permaneceram durante a condução do experimento. Esta câmara foi construída com madeira (2 m de largura, 1,5 m de altura e 5 m de comprimento) e coberta com plástico transparente de 100 µm de espessura. A temperatura interna variou de 24 ± 1 °C (dia) a 18 ± 2 °C (noite). A umidade relativa foi mantida a $90 \pm 5\%$ utilizando um sistema cujos bicos (modelo NEB-100, KGF, São Paulo, Brasil) pulverizavam um nevoeiro acima da copa da planta a cada 30 min. A densidade máxima de fluxo de fótons natural na altura da copa da planta foi de aproximadamente 950 µmol m⁻² s⁻¹.

2.3 Avaliação da doença

A severidade da ferrugem foi avaliada aos 9, 13, 17 e 21 dias após a inoculação (dai) utilizando a escala proposta por Godoy *et al.* (2006). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada planta foi calculada usando a integração trapezoidal das curvas de progresso da doença de acordo com Shaner & Finney (1997). O número de lesões (NL) por cm² de folha trifoliada foi mensurado em três locais escolhidos aleatoriamente na primeira folha trifoliada totalmente expandida (do ápice para a base) de cada planta aos 21 dai.

2.4 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados na primeira folha (do ápice para a base) de cada planta a 9, 13, 17 e 21 dai. A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática ao vapor de água (g_s), a concentração interna de CO_2 (C_i) e a taxa de transpiração (E) foram medidas de 09:00 as 13:00 h sob irradiância artificial e saturante de fótons ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e uma concentração externa de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ utilizando um analisador de gás infravermelho portátil de sistema aberto (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA).

2.5 Análise da fluorescência da Chl a

As imagens e parâmetros da fluorescência de Chl a foram obtidos a partir da primeira folha trifoliolada (do ápice à base) de cada planta utilizando a versão MAXI do fluorômetro Imaging-PAM e o software Imaging Win (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). A passagem de emissão de fluorescência Chl a foram capturados por uma câmara DAC (dispositivo de acoplamento de carga) com uma resolução de 640×480 pixels numa área de amostra visível de 24×32 mm em cada folha. As folhas foram inicialmente adaptadas à escuridão durante 60 min, após isso foram cuidadosamente e individualmente fixadas num suporte a uma distância de 18,5 cm da câmara DAC. As folhas foram então expostas a um feixe de medição fraco, modulado ($0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 100 μs , 1 Hz) para determinar a fluorescência inicial (F_0) quando todos os centros de reação FSII devem ser "abertos". Em seguida, aplicou-se um pulso de saturação de luz branca de $2,400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (10 Hz) durante 0,8s para assegurar a máxima emissão de fluorescência (F_m) quando espera-se que todos os centros de reação FSII estejam "fechados". A partir destas medidas iniciais, a eficiência fotoquímica máxima de FSII das folhas adaptadas ao escuro foi estimada através da razão de fluorescência Chl a variável a máxima, $F_v / F_m = [(F_m - F_0) / F_m]$. Os tecidos foliares foram subsequentemente expostos a irradiação de fótons actínicos ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 120 s para obter o rendimento de fluorescência em estado estacionário (F_s), após o que um pulso de luz branca saturante ($2,400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,8 s) para se conseguir a fluorescência máxima adaptada à luz (F_m'). Seguindo os cálculos propostos por Kramer *et al.* (2004), determinou-se a energia absorvida pelo PSII para os dois seguintes componentes de rendimento para processos dissipativos: o rendimento de fotoquímica [$Y_{II} = (F_m' - F) / F_m'$], o rendimento para dissipação por baixa regulação [$Y(\text{NPQ}) = (F_s / F_m') - (F_s / F_m)$] e o rendimento para outras perdas não-fotoquímicas (não reguladas)

$[Y(NO) = F_s / F_m]$. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software Imaging Win (Kramer *et al.*, 2004).

2.6 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila (Chl) *a*, (Chl) *b* e carotenoides foram determinadas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente (Santos *et al.*, 2008). Cinco discos foliares (1 cm de diâmetro) foram obtidos a partir da primeira folha trifoliolada (do ápice à base) de cada planta. Os discos recolhidos foram imersos em tubos de vidro contendo 5 ml de solução saturada de DMSO e carbonato de cálcio ($CaCO_3$) (5 g / L) (Wellburn, 1994) e mantidos no escuro à temperatura ambiente durante 24 h. As absorvâncias dos extratos foram lidas a 480, 649,1 e 665,1 nm utilizando uma solução saturada de DMSO e $CaCO_3$ como um branco.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado em esquema fatorial, sendo constituído pelos fatores: tratamentos (água destilada, ASM e Epo + Pir) e inoculação (plantas não inoculadas ou inoculadas). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. O experimento foi repetido uma vez. Cada unidade experimental correspondem a um vaso de plástico contendo três plantas. Os dados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) usando o software SAS (SAS Instituto Inc., Cary, NC).

3 RESULTADOS

3.1 Severidade da ferrugem asiática da soja, AACPD e NL

A severidade da ferrugem progrediu mais rapidamente nas folhas das plantas do tratamento controle em comparação com os demais tratamentos (Fig. 1A). A AACPD foi significativamente reduzida em 32,5 e 88,7% para os tratamentos ASM e fungicida, respectivamente, em comparação com o tratamento de controle (Figura 1B). Similarmente, houve reduções significativas de 57,9 e 84,9% para o NL para os tratamentos ASM e fungicida, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 1C).

3.2 Parâmetros de trocas de gasosas

Os valores de *A* foram significativamente maiores em 41,6, 57,3 e 19,6% em plantas tratadas com ASM e de 48,8, 70,7 e 44,8% em plantas tratadas com fungicida aos 13, 17 e 21 dai, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Fig. 2A). Similarmente para *g_s*, foi observado um aumento de 41,1, 54,4 e 27,8% para o tratamento ASM aos 9, 17 e 21 dai

e de 35,4, 30,4, 69,5 e 33,8% para o tratamento fungicida aos 9, 13, 17 e 21 dai, respectivamente (Fig. 2B). Para as plantas não inoculadas, A foi significativamente menor em 8,9% quando tratada com fungicida, enquanto que, para os valores de g_s houve redução significativa de 13,4 e 18,4% para os tratamentos ASM e fungicida, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figuras 2A e B). Para C_i , houve aumento significativo de 13,3 e 9,3% aos 9 dai, de 5,4 e 7,4% aos 17 dai e de 8,6 e 10,7% aos 21 dai em plantas do tratamento de controle quando comparado aos tratamentos ASM e fungicida, respectivamente (Figura 2C). Os valores de E foram significativamente maiores em 6,1, 54,7 e 30,5% em plantas tratadas com ASM e em 20,3, 73,4 e 26,7% em plantas tratadas como fungicida, respectivamente, aos 13, 17 e 21 dai em comparação ao tratamento de controle (Fig. 2D).

3.3 Análise da fluorescência da Chl a

Além da avaliação quantitativa de parâmetros de fluorescência de Chl a , uma análise visual da eficiência fotossintética utilizando imagens de fluorescência Chl a foram realizadas em folhas de plantas inoculadas ou não inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com água (tratamento controle), ASM e Epo + Pir (Figuras 3 e 4). Notavelmente, a magnitude das alterações em F_0 , F_m , F_v / F_m (Fig. 5) assim como em $Y(II)$, $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$ (Fig. 6) para o tratamento controle foram mais evidentes em contraste ao observado nos demais tratamentos. As primeiras alterações foram evidentes em folhas das plantas do tratamento controle logo aos 9 dai (Figuras 5 e 6) e aumentaram progressivamente a medida que as lesões da FAS evoluíram (Figuras 5 e 6). Por outro lado, as folhas de plantas tratadas com fungicida, por apresentarem menores níveis de FAS, demonstraram menores alterações fotoquímicas, indicando um menor dano ao sistema fotossintético. Os valores dos parâmetros F_0 , F_m , F_v / F_m , $Y(II)$ e $Y(NPQ)$ foram consistentemente maiores para os tratamentos ASM e, principalmente, para o fungicida Epo + Pir em comparação com o tratamento de controle durante o período de avaliação (Figuras 3 e 4). Assim, os valores de F_0 foram significativamente maiores em 21,7, 55,6 e 55,4% para o tratamento com ASM e em 24,0, 56,5 e 66,4% para o tratamento com fungicida, respectivamente, aos 13, 17 e 21 dai quando comparado ao tratamento controle (Figura 3A). Similarmente, os valores de F_m foram significativamente maiores em 11,8, 19,9, 70,03 e 56,5% em plantas tratadas com ASM e em 6,3, 26,7, 75,5 e 77,1% em plantas tratadas com o fungicida aos 9, 13, 17 e 21 dai, respectivamente (Fig. 3B). Os valores de F_v / F_m foram significativamente maiores em 14% aos 17 dai para o tratamento ASM e 18,9 e 15,7% para o tratamento com fungicida aos 17 e 21 dai, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 3C). Comparado ao tratamento controle, foram observados aumentos significativos de 13,4,

18,0 e 31,9% nos valores Y (II) aos 13, 17 e 21 dai para o tratamento ASM e de 20,4, 14,0, 39,9 e 36,6% para o tratamento fungicida durante todo período de avaliação (Fig. 4A). Similarmente, os valores de Y (NPQ) aumentaram significativamente em 32,1 e 24,1% em plantas tratadas com ASM aos 17 e 21 dai, respectivamente. Para plantas tratadas com fungicida, os valores de Y (NPQ) foram significativamente superiores em 13,6, 27,0 e 29,4% aos 13, 17 e 21 dai, respectivamente, quando comparado aos valores do tratamento controle (Figura 4B). Por outro lado, os valores de Y (NO) foram significativamente menores em 15,9% nas plantas não inoculadas para o tratamento com fungicida em comparação com o tratamento controle (Fig. 4C). Para Y /(NO), houve reduções significativas de 34,9 e 29,3% em plantas tratadas com ASM, respectivamente, aos 17 e 21 dai em relação ao tratamento controle. Da mesma forma, houveram reduções significativas de 26,9, 16,7 e 37,2% em plantas tratadas com fungicida, respectivamente, aos 13, 17 e 21 dai.

3.4 Concentração de pigmentos

A concentração de Chl $a + b$ aumentou significativamente em 32,3 e 55,9% nas plantas tratadas com ASM e em 43,2 e 66,2% nas plantas tratadas com fungicida aos 17 e 21 dai, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 7A). A concentração de carotenoides aumentou significativamente em 23,1 e 30,9% em plantas tratadas como ASM e em 43,1 e 49,1% em plantas tratadas com o fungicida aos 17 e 21 dai, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 7B).

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma evidência direta do efeito negativo causado pela infecção de *P. pachyrhizi* ao aparato fotossintético de folhas de soja foi reduzido pelo tratamento foliar com Epo + Pir, e em menor proporção por ASM. De fato, esses tratamentos permitiram que o processo fotossintético permanecesse positivamente regulado a nível fotoquímico (F_v/F_m , F_o , F_m , $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$) associado a uma menor danos ao pigmentos e a uma maior capacidade de troca de gasosas (A , g_s , E e C_i). Estes resultados são baseados na hipótese que ASM e Epo + Pir aumentou a resistência da soja à FAS e, conseqüentemente, reduziram a severidade da doença e o número de pústulas por folha (Miles *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2013; 2014). Sabe-se que os fungicidas inibidores de quinina oxidase (QoI “estrobirulinas”) afetam tanto a germinação dos esporos como a penetração pelo fungo nos tecidos do hospedeiro (Bartlett *et al.*, 2002), ambas fases do processo infeccioso são importantes para que a infecção fúngica seja bem sucedida. Os fungicidas inibidores da desmetilação (DMI, “triazóis”) também afetam a colonização pelos fungos dentro dos tecidos das plantas (Kuck *et al.*, 2012). De acordo com Cruz *et al.* (2013), o efeito, da aplicação prévia do ASM em reduzir os sintomas da FAS foi relacionado ao aumento das atividades de quitinases e fenilalanina amônia-liases.

De acordo com os resultados do presente estudo, plantas não inoculadas pulverizadas com Epo + Pir apresentarem menor abertura stomatal e, conseqüentemente, uma redução na taxa de assimilação de carbono. As estrobirulinas e os triazóis quando aplicados isoladamente ou combinados podem causar danos ao mecanismo fotossintético como já demonstrado previamente em videiras (Petit *et al.* 2012). Para alguns cereais, a redução na fotossíntese em plantas pulverizadas por estrobirulinas pode ser associado a causas estomatais, portanto, o influxo de CO₂ para os espaços intercelulares e a capacidade de carboxilação nos cloroplastos são comprometidos (Nason *et al.* 2007; Debona *et al.* 2016). O processo fotossintético das plantas respondem de modos distintos quando pulverizados com triazóis, podendo ser comprometido ou não. Por exemplo, a aplicação de epoxiconazole em plantas alteraram a capacidade de transporte de elétrons nos tilacóides, limitando assim a fase fotoquímica (Benton & Cobb 1997; Petit *et al.* 2012). Apesar de triazóis e estrobirulinas poderem estar associados a limitações fotossintéticas nas plantas, seus efeitos são desprezíveis se comparados aos danos causados por patógenos. Plantas de arroz infectadas por *Bipolaris oryzae* apresentaram uma menor capacidade de fixação do carbono devido a incapacidade de condutância estomatal que limitou o influxo de CO₂ para as células do mesofilo foliar, sendo este efeito significativamente atenuado devido a aplicação de azoxystrobina (Debona *et al.* 2016). Contudo, neste estudo a

FAS reduziu drasticamente a fotossíntese em plantas do tratamento controle, sendo em menor proporção em plantas tratadas com ASM e, principalmente com Epo + Pir.

Houve reduções progressivas em A e g_s à medida que os sintomas de FAS se desenvolveram, sendo que a magnitude da redução foi menor em plantas pulverizadas com ASM e, principalmente, quando tratadas com Epo + Pir. De acordo com Alves *et al.* (2011), a redução de A nas folhas de *Eucalyptus urophylla* em resposta à infecção por *Puccinia psidii* foi relacionada a danos na área foliar verde. No entanto, apesar da menor abertura estomática reduzida, era esperado uma redução na concentração de CO_2 no mesófilo foliar, entretanto houve um aumento significativo nos valores de C_i nas folhas infectadas. Estes resultados demonstrando reduções em A e g_s e aumentos em C_i foram também relatados para as interações *Eucalyptus urophylla* - *Puccinia psidii* (Alves *et al.*, 2011), feijão-*Uromyces appendiculatus* (Bassanezi *et al.*, 2002) e cevada - *Rhynchosporium secalis* (Martin *et al.*, 1986). De acordo com esses autores, a redução em A provavelmente não foi associada com o menor influxo de CO_2 no interior das folhas, mas a alguma limitação bioquímica na fixação de CO_2 a nível do cloroplasto. Estas as alterações a nível bioquímico podem estar interligadas a menor atividade da ribulose bifosfato carboxilase e às mudanças na capacidade de regeneração do ribulose bisfosfato (Hiscox & Israelstam, 1979). As reduções em E para as plantas de soja infectadas a partir do tratamento controle podem estar ligadas a reduções em g_s e, portanto, podem estar associadas ao fechamento estomático. Resende *et al.* (2012) relataram que E diminuiu drasticamente em folhas de sorgo infectadas por *Colletotrichum sublineolum* como mecanismo para manter os estômatos fechados e manter a concentração de água no interior das folhas infectadas. Também foram relatadas reduções concomitantes em E e g_s para outras interações hospedeiro-patógeno (McGrath & Pennypacker, 1990; Duniway & Durbin, 1971; Bassanezi *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2011).

Plantas tratadas com ASM e, principalmente, com Epo + Pir e infectadas com *P. pachyrhizi*, apresentaram maiores valores de F_0 e F_m quando comparado as plantas infectadas a partir do tratamento controle, estas últimas apresentaram alterações funcionais nos fotossistemas seguidas por reduções drásticas na concentração de pigmentos fotossintéticos que finalmente afetaram a eficiência da captação e excitação da energia luminosa. A eficiência máxima na qual a luz é absorvida pelo FSII para reduzir o Q_A é representada pelo parâmetro F_v/F_m , que é um indicador sensível do desempenho fotossintético das plantas sendo que os valores devem estar próximos de 0,8 para a maioria das espécies de plantas (Krause & Weis, 1991). Os valores de F_v/F_m para folhas de plantas infectadas a partir do tratamento controle

foram significativamente menores que 0,8 indicando, portanto, danos nos centros de reação associados aos fotossistemas fotossintéticos. No caso das plantas infectadas pulverizadas com Epo + Pir, os valores de F_v/F_m permaneceram mais próximos dos valores obtidos para as plantas não infectadas, sugerindo que a ação de Epo + Pir na infecção fúngica diminuiu o seu efeito danoso sobre o aparelho fotossintético. Similarmente, a severidade da ferrugem em folha de cafeeiro foi reduzida quando pulverizados com Epo + Pir, e esta redução foi acompanhada por uma melhor capacidade fotossintética por causa de um menor dano fotoquímico como demonstrado por maiores valores de F_o , F_m e F_v/F_m (Honorato *et al.*, 2015). Para as plantas infectadas pulverizadas com ASM, os valores F_o , F_m e F_v/F_m foram maiores quando comparado ao controle infectado, mas em menor proporção ao tratamento com fungicida. Os valores de $Y(II)$ foram maiores para as plantas pulverizadas com ASM e principalmente, com Epo + Pir demonstrando que a dissipação de energia foi canalizada para o processo fotoquímico, sem apresentar alterações diante da infecção por *P. pachyrhizi*. O aumento do dano fotooxidativo nos tecidos foliares é frequentemente seguido por aumentos progressivos nos valores de $Y(NO)$, sugerindo, portanto, que os mecanismos reguladores de proteção se tornam fisiologicamente ineficientes (Klughammer & Schreiber, 2008). Os valores de $Y(NO)$ para as plantas pulverizadas com ASM ou Epo + Pir foram inferiores em comparação com as plantas do tratamento controle. Por outro lado, os valores para o parâmetro $Y(NPQ)$ em plantas tratadas com ASM ou Epo + Pir permaneceram mais elevados durante a infecção pelo patógeno quando comparado ao com plantas do tratamento controle. Isto sugere que a ocorrência de dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor seria um mecanismo fisiológico de fotoproteção nos fotossistemas (Krause & Weis, 1991). A maior intensidade de FAS encontrada em plantas de soja do tratamento controle, comparado com as plantas dos demais tratamentos, proporcionaram uma perda de eficiência do uso de energia luminosa importantes para as reações de fixação de carbono. Considerando as reduções concomitantes nos valores de F_v/F_m , $Y(II)$ e $Y(NPQ)$ nas folhas de plantas inoculadas do tratamento controle é provável que a capacidade de fotoproteção também tenha sido perdida, o que resultou em um aumento do dano foto-oxidativo nos tecidos foliares, sendo também pode indicado pelo aumentos progressivos nos valores de $Y(NO)$ como relatados por Klughammer & Schreiber (2008). Portanto, tanto a energia de excitação direcionada à conversão fotoquímica quanto os mecanismos reguladores de proteção tornam-se ineficazes (Klughammer & Schreiber, 2008).

Uma concentração adequada de pigmentos fotossintéticos nas células vegetais e a integridade da membrana plasmática são de importância para a preservação da fotossíntese

(Matsuda *et al.*, 2004). As concentrações de Chl *a* + *b* e carotenoides foram maiores para as plantas pulverizadas especialmente com Epo + Pir, demonstrando o potencial dos fungicidas como as estrobirulinas e os triazóis em aumentar as concentrações de pigmentos fotossintéticos em plantas (Pinhero *et al.*, 1994; Bartlett *et al.*, 2002). Foi relatado que a síntese de clorofilas, um fenômeno conhecido como efeito verde, que está associado à senescência tardia da folha e à maximização da produtividade, foi maior devido a pulverização de estrobirulinas (Bartlett *et al.*, 2002). Além disso, uma maior concentração de Chl *a* + *b* levaria a um aumento na eficiência das folhas para capturar a energia necessária para que as reações fotoquímicas durante a fotossíntese (Buchenauer & Rohner, 1981). Reduções nas concentrações de pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas de soja infectadas com *P. pachyrhizi*, bem como para outras interações hospedeiro-patógeno, como *Stenocarpella macrospora* em milho, *Phakopsora pachyrhizi* em soja, *Hemileia vastatrix* em café, *Pyricularia oryzae* em trigo e arroz tem sido demonstrada (Kumudini *et al.*, 2008; Rios *et al.*, 2013; Honorato *et al.*, 2014; Tatagiba *et al.*, 2014; Bermúdez-Cardona *et al.*, 2014).

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que a pulverização de plantas de soja com ASM e, principalmente, com Epo + Pir reduziram os efeitos negativos causados pela infecção por *P. pachyrhizi* e permitiu um bom desempenho fotossintético das plantas infectadas.

5 REFERÊNCIAS

- Alves AA, Guimaraes LMS, Chaves ARM, DaMatta FM & Alfenas AC (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiol Plant*, 33:1831–1839.
- Baker NR, Oxborough K, Lawson T & Morison JIL (2001) High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *J Exp Bot* 52:615–621.
- Baker NR. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol*, 59:89–113.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M & Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci*, 58:649–662.
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A & Berger RD (2002) Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *J Phytopathology*, 150:37–47.
- Bastiaans L (1993) Effects of leaf blast on growth and production of a rice crop. *Neth J Plant Pathol*, 99:323–334.
- Benton JM & Cobb AH. (1997) The modification of phytosterol profiles and *in vitro* photosynthetic electron transport of *Galium aparine* L. (cleavers) treated with the fungicide, epoxiconazole. *Plant Growth Regul*, 22:93–100.
- Bermúdez-Cardona M, Wordell Filho JM & Rodrigues FA. (2015) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in maize leaves infected with *Stenocarpella macrospora*. *Phytopathol*, 105:26–34.
- Buchenauer H & Rohner E (1981) Effects of triadimefon and triadimenol on growth of various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism in shoot of barley seedlings. *Pestic Biochem Physiol*, 15:58–70.
- Cruz MFA, Rodrigues FA, Rodriguez LP, Curvelo CRS, Nascimento KJT, Moreira MA & Barros EG (2013) Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi*. *Bragantia*, 72:162–172.
- Cruz MFA, Rodrigues FA, Diniz APC, Moreira MA & Barros EG (2014) Soybean resistance to *Phakopsora pachyrhizi* as affected by acibenzolar-S-methyl, jasmonic acid and silicon. *J Phytopathol*, 162:133–136.
- Dallagnol LJ, Navarini L, Ugalde MG, Balardin RS & Catellam R (2006) Utilização de acibenzolar-S-methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathol*, 32:255–259.

- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MV & Pereira SC (2011) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathol*, 101:92-104.
- Debona D, Rios JA, Nascimento KJT, Silva LC & Rodrigues FA (2016) Influence of magnesium on physiological responses of wheat infected by *Pyricularia oryzae*. *Plant Pathol*, 65:114–123.
- Duarte HSS, Zambolim L, Rodrigues FA, Rios JA & Lopes UP (2009) Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. *Ciência Rural*, 39:2271–2277.
- Duniway JM & Durbin RD (1971) Some effects of *Uromyces phaseoli* on the transpiration rate and stomatal response of bean leaves. *Phytopathol*, 61:114–119.
- Fehr WR & Caviness CE. (1977) Stages of Soybean Development. Ames: Iowa State University Press. Special Report 80.
- Godoy CV, Koga LJ & Canteri MG (2006) Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitop Bras*, 31:63–68.
- Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, Conrath U, Koch E & Schaffrath U (2010) *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol Plant Path*, 11:169–177.
- Hartman GL, Wang TC & Tschanz AT (1991) Soybean rust development and quantitative relationship between rust severity and soybean yield. *Plant Dis*, 75:596–600.
- Hiscox JD & Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* 57:1332–1334.
- Honorato Junior J, Zambolim L, Aucique-Perez CE, Resende RS & Rodrigues FA (2015) Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pestic Biochem Physiol*, 123:31–39.
- Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED & Grodzinski B (2012) Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathol*, 61:1052–1062.
- Klughammer C & Schreiber U (2008) Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Appl Notes*, 1:27–35.
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O & Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res*, 79:209–218.

Krause GH & Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42:313–349.

Kuck KH, Stenzel K & Vors J.-P (2012) Sterol Biosynthesis Inhibitors. In: Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M. (eds.) *Modern Crop Protection Compounds*. Volumes 1-3, 2nd Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Kumudini S, Prior E, Omielan J & Tollenaar M (2008) Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. *Crop Sci*, 48:2343–2350.

Langenbach C, Campe R, Beyer SF, Mueller AN & Conrath U (2016) Fighting Asian soybean rust. *Front Plant Sci*, 7:797.

Martin PJ (1986) Gaseous exchange studies of barley leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 28:3–14.

Matsuda R, Ohashi-Kaneko K, Fujiwara K, Goto E & Kurata K (2004) Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiol*, 45:1870–1874.

Miles MR, Levy C, Morel W, Mueller T, Steinlage T, van Rij N, Frederick RD & Hartman GL (2007) International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Dis* 91:1450–1458.

Nason MA, Farrar J & Bartlett D (2007) Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. *Pest Manag Sci*, 63:1191–1200.

Ogle HJ, Byth DE & McLean R (1979) Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in South-eastern Queensland. *Aust J Agricultural Res*, 30:883–893.

Petit AN, Vaillant N, Boulay M, Clement C & Fontaine F (2006) Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology* 96:1060–1066.

Pinhero RG & Fletcher RA (1994) Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedlings from high and low temperature stresses. *Plant Growth Regul*, 15: 47–53.

Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SC, Moreira WR, Chaves AR & DaMatta FM (2012) Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathol*, 102:892–898.

Rios JA, Rodrigues FA, Debona D & Silva LC (2014) Photosynthetic gas exchange in leaves of wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. *Acta Physiol Plant*, 36:371–379.

- Rodrigues FA, Duarte HSS, Domiciano GP, Souza CA, Korndörfer GH & Zambolim L (2009) Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australas Plant Pathol*, 38:366-372.
- Rolfe SA & Scholes JD (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*, 247:163–175.
- Rousseau C, Belin E, Bove E, Rousseau D, Fabre F, Berruyer R, Guillaumès J, Manceau C, Jacques MA & Boureau T (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9–17.
- Ruske RE, Gooding MJ, Jones SA. (2003) The effects of triazole and strobilurin fungicide programmes on nitrogen uptake, partitioning, remobilization and grain N accumulation in winter wheat cultivars. *J Agric Sci*, 140: 395–407.
- Santos RP, Cruz ACF, Iarema L, Kuki KN & Otoni WC. (2008) Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, 55:356–364.
- Shaner G & Finney RE. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051–1056.
- Sinclair JB & Hartman GL (1999) Soybean Rust. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC. (eds) *Compendium of Soybean Diseases*. St. Paul: MN. The American Phytopathological Society, pp 25–26.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 144:307–13.
- Wu YX & von Tiedemann A (2001) Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat. *Pestic Biochem Physiol*, 71:1–10.
- Yamanaka N, Yamaoka Y, Kato M, Lemos NG, Passianotto ALL, Santos JVM, Benitez ER, Abdelnoor RV, Soares RM & Suenaga K (2010) Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust population. *Trop Plant Pathol*, 35:153–162.
- Zhao D, Glynn NC, Glaz B, Comstock JC & Sood S (2011) Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Dis*, 95:640–647.

FIGURAS

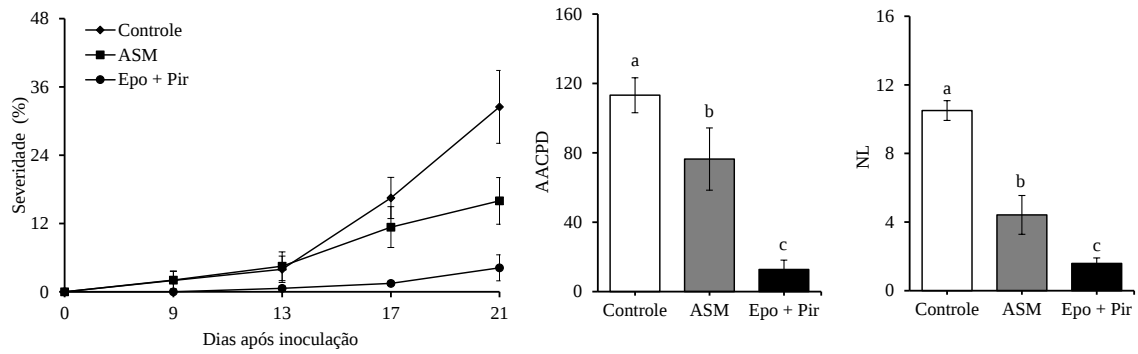


Figura 1

FIG. 1. Severidade da ferrugem da soja (A), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (B) e número de lesões por cm² de área foliar (C) para plantas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Phakopsora pachyrhizi* (controle) e tratadas com água (controle), Acibenzolar-S-Metil (ASM) e fungicida Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir). Para o AACPD e NL, os dos tratamentos seguidos com letras diferentes são significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão da média. n = 6.

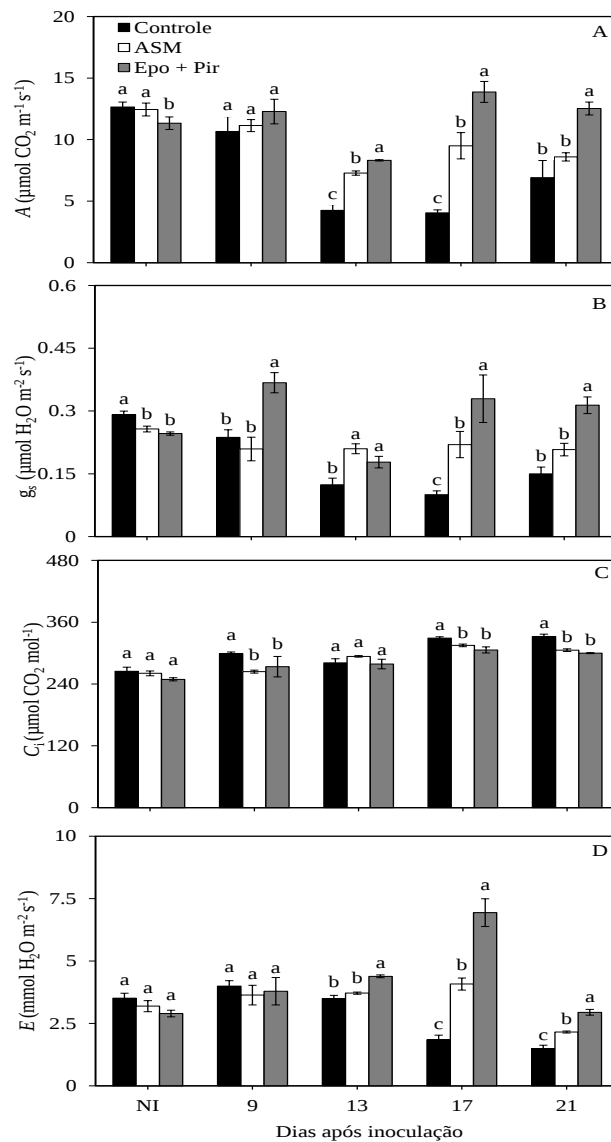


Figura 2

FIG. 2. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s) (B), concentração interna de CO₂ (C_i) (C) e taxa de transpiração (E) (D) determinada em folhas trifolioladas de plantas de soja não inoculadas (NI) ou inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir). As médias dos tratamentos aos 9, 13, 17 e 21 dias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam médias dos tratamentos e as linhas verticais indicam os desvios padrão da média. $n = 6$.

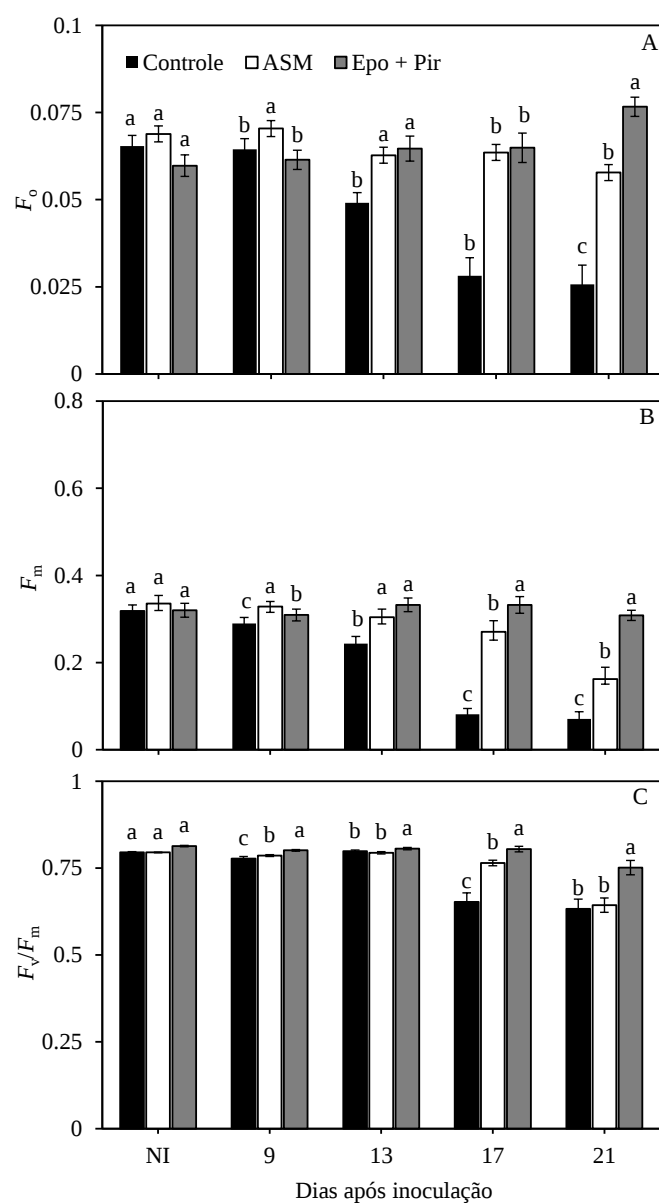


Figura 3

FIG. 3. Fluorescência inicial (F_0) (A), fluorescência máxima (F_m) (B) e eficiência quantitativa máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (C) determinada em folhas de plantas de soja não inoculadas ou inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e tratadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculado com *P. pachyrhizi* e pulverizado com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir). As médias de tratamento em cada período de avaliação seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam médias e as linhas verticais indicam os desvio padrão da média. $n = 6$.

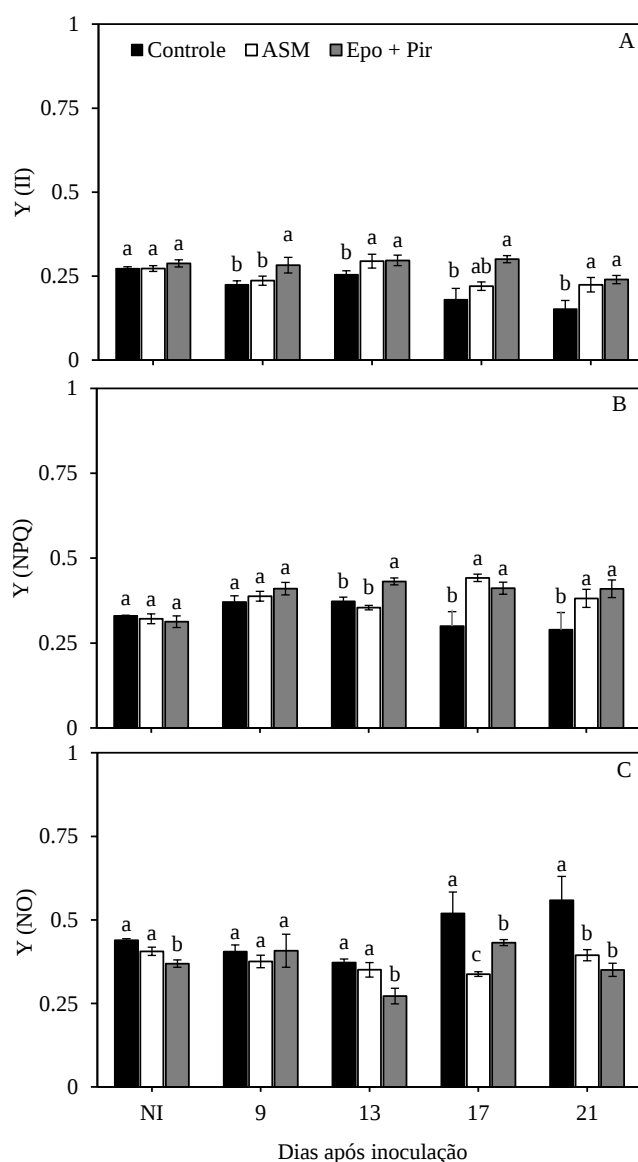


Figura 4

FIG. 4. Rendimento quantitativo do fotossistema II (Y(II)) (A), rendimento quântico da dissipação de energia regulada (Y(NPQ)) (B) e rendimento quântico de energização dissipada não regulada (Y(NO)) (C). Folhas de plantas de soja não inoculadas (NI) ou inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir). As médias de tratamento em cada período de avaliação seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam médias e as linhas verticais indicam os desvio padrão da média. $n = 6$.

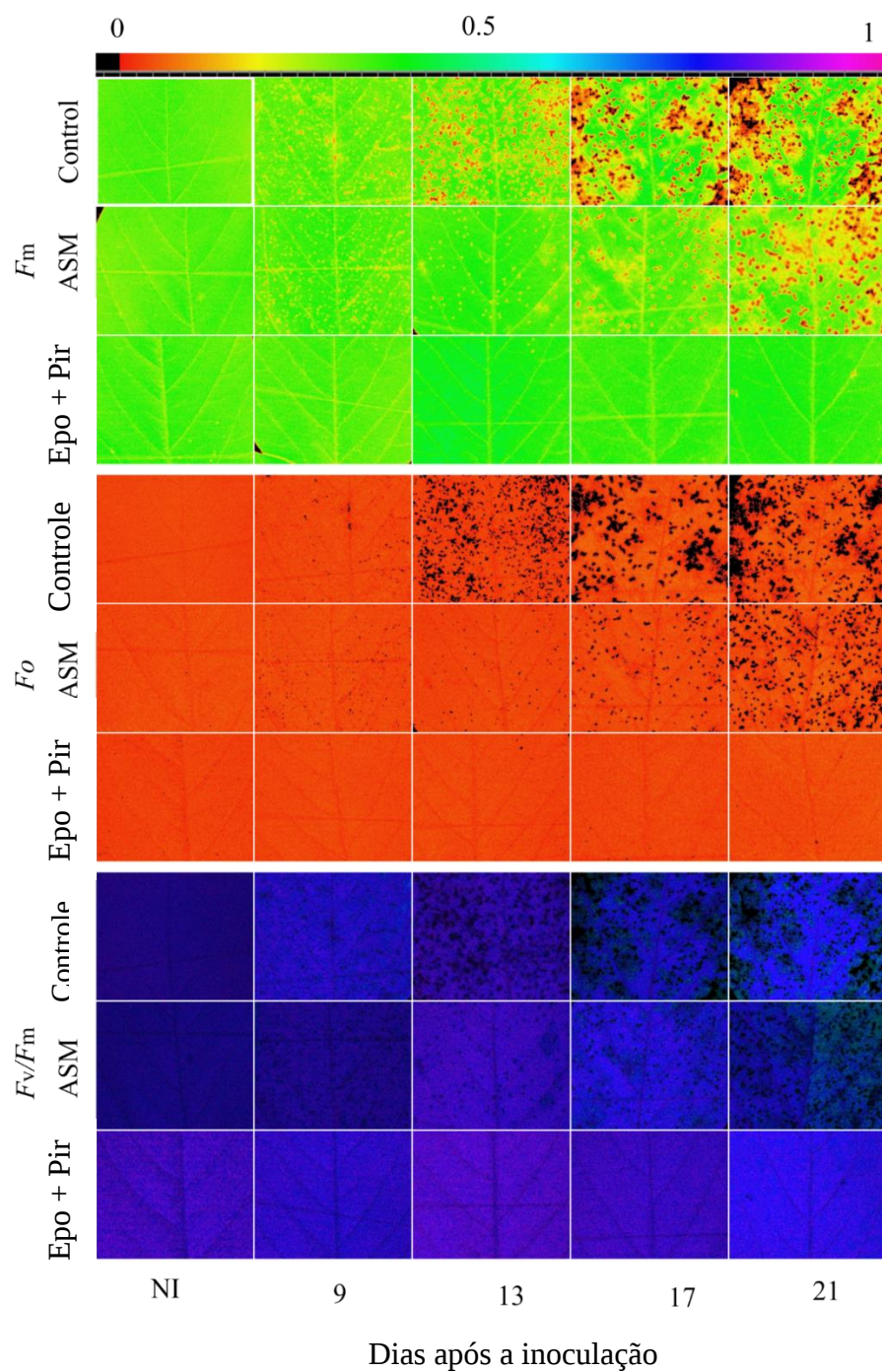


Figura 5

FIG. 5. Fluorescência inicial (F_0) (A), fluorescência máxima (F_m) (B) e eficiência quantitativa máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (C) da fluorescência de clorofila a em folhas de soja. Plantas não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (

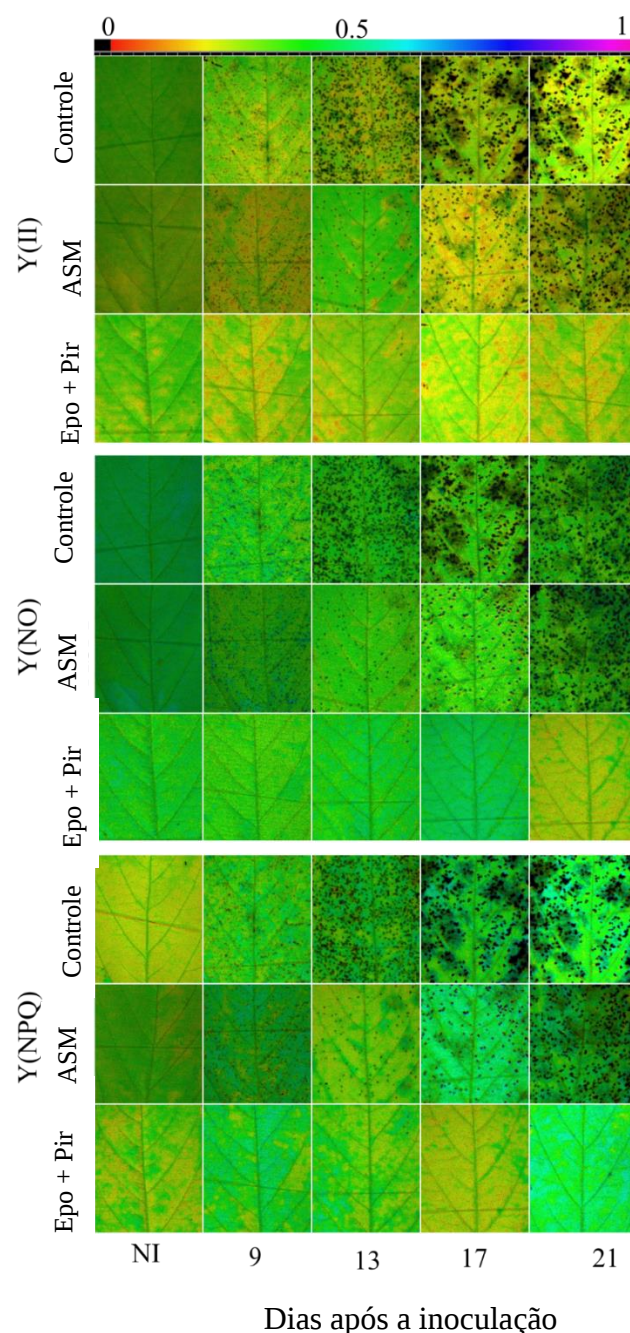


Figura 6

FIG. 6. Rendimento quantitativo efetivo do fotossistema II (Y (II)) (A), rendimento quântico de dissipação de energia regulada Y (NPQ) (B) e rendimento quântico de energização não regulada Y (NO) (C) determinada nas folhas de soja plantas não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculadas com *P. pachyrhizi* e pulverizadas com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir).

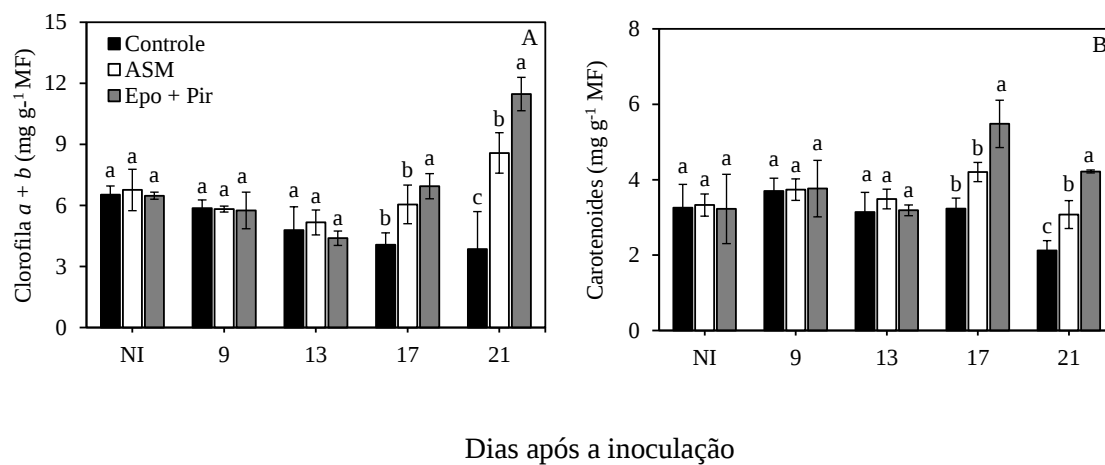


Figura 7

FIG. 7. Clorofila total (Chl *a* + *b*) (A), e carotenoides (B) nas folhas de plantas de soja não inoculadas (NI) ou inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* (controle), inoculadas com *P. pachyrhizi* e tratadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e inoculado com *P. pachyrhizi* e tratado com Epoxiconazole (Epo) + Piraclostrobina (Pir). As médias de tratamento em cada período de avaliação seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam médias e as linhas verticais indicam os desvio padrão da média. n = 6. *MF- Matéria fresca