

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**JÉSSICA PIGATTO DE QUEIROZ BARCELOS**

**NÍQUEL NO CONTROLE DO OÍDIO (*Erysiphe diffusa*) E FERRUGEM  
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*) NA CULTURA DA SOJA**

**Ilha Solteira**

**2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Ilha Solteira

**JÉSSICA PIGATTO DE QUEIROZ BARCELOS**

**NÍQUEL NO CONTROLE DO OÍDIO (*Erysiphe diffusa*) E FERRUGEM  
ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*) NA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP – Câmpus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

Prof. PhD. André Rodrigues dos Reis  
**Orientador**

Ilha Solteira

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Barcelos, Jéssica Pigatto de Queiroz.

B242n      Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) e ferrugem asiática  
(*Phakopsora pachyrhizi*) na cultura da soja / Jéssica Pigatto de Queiroz  
Barcelos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016  
160 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de  
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2016

Orientador: André Rodrigues dos Reis  
Inclui bibliografia

1. Adubação de soja com níquel. 2. Controle de doenças de soja .  
3. Interação entre níquel e fungicidas comerciais.

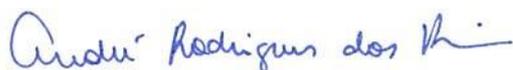
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) e ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) na cultura da soja

**AUTORA: JÉSSICA PIGATTO DE QUEIRÓZ BARCELOS**

**ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS  
Coordenadoria de Curso de Engenharia de Biosistemas / Câmpus Experimental de Tupã



Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI  
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. MILTON FERREIRA DE MORAES  
Ciência do Solo / Universidade Estadual do Mato Grosso

Ilha Solteira, 14 de julho de 2016

DEDICO...

Aos meus pais, Valter de Queiroz Barcelos e Selma Pigatto de Queiroz Barcelos, e ao meu irmão Gabriel Pigatto de Queiroz Barcelos, por sempre acreditarem no meu potencial, por todos os sacrifícios, apoio e suporte para lutar pelos meus objetivos, pelos ensinamentos valiosos a mim passados e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

OFEREÇO...

Ao meu namorado Heitor Pontes Gestal Reis por todo apoio, amizade e companheirismo ao longo de todos esses anos, e também por todo amor, carinho, paciência e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos, paz, saúde e proteção concedidas, além de guiar e iluminar meus caminhos durante minha jornada.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial à Faculdade de Engenharia, campus de Ilha Solteira, por proporcionar excelentes condições de aprendizado aos alunos da instituição.

Aos professores do curso de Agronomia da UNESP - Ilha Solteira, pelo empenho e dedicação aos alunos desta universidade, sempre acreditando em um futuro melhor.

Ao Prof. PhD André Rodrigues dos Reis, pelo conhecimento transmitido, confiança, incentivo, paciência e pelas oportunidades manifesto minha gratidão pela grande contribuição em minha vida acadêmica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Enes Furlani Junior pelo suporte oferecido durante o desenvolvimento do projeto, pelo conhecimento transmitido, pela confiança e amizade.

Aos pesquisadores Dr. Claudia Godoy, Dr. Adonis Moreira, Dr Larissa Moraes, Dr. Alvaro Almeida, aos técnicos Allan, Rodrigo, Angelo, e aos demais colegas que me ajudaram enquanto estive na Embrapa Soja, Flavia, Helen, Vitor, Gabriela, Isabella, Carolina, Leide, Alda, Gisele.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Leal e toda sua equipe que contribuíram com o desenvolvimento de parte do presente trabalho.

Às amigas Laura Oliveira, Isabô Melina, Ligia Videira, Isabella Peres, Kézia e Manuela, Rayssa Camargo, Elen Menezes, Sabrina Martins, Jaqueline Lima, Camila Vieira e Jéssica Alcântara, e aos amigos Vinícius Martins, Victor Coleta, Henrique Nardy, Orlando Baltazar pela amizade, paciência e por todas as boas memórias.

Aos colegas de trabalho Vinicius Martins, Amanda Paixão, Simone Hiraki, Carlos Sanches, Mirella dos Santos, Jailson Aguilar, Felipe Capobianco, Daniel Franchin, Pedro Ehrenberg, ao meu irmão Gabriel e ao meu namorado Heitor, os quais contribuíram para o desenvolvimento deste experimento.

Aos meus tios Rosilande de Queiroz Barcelos e José Roberto de Oliveira, e aos meus sogros Rita de Cassia Pontes Gestal e Reis e Hamilton dos Reis, pelo apoio e suporte quando estava longe de casa.

Aos meus avós Dirce Valério Pigatto e Antonio Pigatto (In memorian), Valfrides Queiroz Barcelos e Aurení Queiroz Barcelos, aos meus padrinhos Antonio

Pigatto e Rosi Pigatto, minhas primas Fernanda Pigatto e Carolina Queiroz Barcelos, e à todos os meus tios e primos, pelo apoio e suporte dedicados a mim e a minha família.

À Capes pelo auxílio financeiro, indispensável para a execução deste experimento.

Enfim, a todos que estiveram juntos nesta caminhada e que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo de céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar; Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”

Eclesiastes 3:1-8

## RESUMO

O níquel (Ni) é um micronutriente para as plantas por ser componente estrutural da urease, enzima que catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono e amônia, além disso, tanto Ni quanto a urease desempenham importante papel no metabolismo antioxidante da planta e no controle de doenças fungicas. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação foliar de doses de Ni associado ou não à fungicidas do grupo das estrobilurinas em plantas de soja sobre o controle de doenças fungicas, a atividade de enzimas antioxidantes, a produtividade e sobre a qualidade de sementes. Foram realizados três experimentos sendo o primeiro na Chapadão do Sul – MS utilizando a molécula Piraclostrobina (75 g i.a. ha<sup>-1</sup>), o segundo em Selviria – MS utilizando as moléculas Fluxapiróxade + Piraclostrobina (300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>), e o terceiro experimento foi realizado em Londrina – PR utilizando as moléculas Picoxistrobina + Ciproconazole (300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>). Os três experimentos foram realizados em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 7 x 2, sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associadas ou não aos fungicidas, e quatro repetições totalizando 56 parcelas, os tratamentos foram aplicados no estágio fenológico R1 em todos os experimentos, e apenas no experimento III foi realizada uma segunda aplicação em R4. Junto do experimento III também foi realizado um experimento em placas de petri para avaliar o efeito do Ni sobre a germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* com os seguintes tratamentos Picoxistrobina + Ciproconazole 100 mL L<sup>-1</sup> como controle; (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 5,0 g L<sup>-1</sup> de Ni) com seis repetições. No experimento I houve aumento nos teores de nitrogênio e de índice SPAD, e nas menores doses de Ni houve aumento de produtividade. Em relação a qualidade fisiológica de sementes, a porcentagem de germinação e a taxa de emergência aumentaram linearmente com o aumento das doses de Ni sem fungicida. Porém, quando o Ni foi associado a piraclostrobina a porcentagem de germinação apresentou ajuste quadrático, com aumento da germinação até a dose de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni. No experimento II houve a ocorrência natural de oídio (*Erysiphe diffusa*), e a aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado a 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do fungicida reduziu a severidade do oídio a 99%, foram observadas atividades máximas das enzimas urease, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). No experimento III no ensaio de placas, a aplicação de Ni controlou a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, no campo entretanto o Ni não foi eficiente no controle da ferrugem asiática, e não houve diferença significativa para produtividade. A combinação de doses de Ni e fungicida aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, indicando a formação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar. Em todos os experimentos houve aumento os teores de Ni nas folhas e nos grãos Houve efeito sinérgico dos fungicidas sobre a atividade da urease nas menores doses.

**Palavras-chave:** Ureia. Controle de doenças. Soja. *Glycine max*. Enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

Nickel (Ni) is a micronutrient for the plants to be structural component of urease, an enzyme that catalyzes the degradation of urea to ammonia and carbon dioxide, in addition, both Ni and urease plays an important role in antioxidant metabolism of the plant and control of fungal diseases. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of foliar application of Ni doses with or without group of fungicides of the strobilurin in soybean plants under the control of fungal diseases, the activity of antioxidant enzymes, productivity and the quality seeds. Three experiments were conducted being the first in Chapadão Sul - MS using Pyraclostrobin molecule (75g a.i. ha<sup>-1</sup>), the second Selvíria - MS using the Fluxapyroxad + Pyraclostrobin molecules (300ml c.p. ha<sup>-1</sup>) and the third experiment was performing in Londrina - PR using the Picoxystrobin + Cyproconazole molecules (300ml pc ha<sup>-1</sup>). The three experiments were performed in design of randomized blocks in a factorial 7 x 2, seven Ni doses (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associated or not to fungicides, and four replications totaling 56 plots, the treatments were applied at the phenological stage R1 in all experiments, and only in the experiment III was carried out a second application in R4. Along III experiment was also performed an experiment in petri plates to evaluate the effect of Ni on the germination of *Phakopsora* uredospores *phachyrhizi* with the following Picoxystrobin Cyproconazole + 100 mL L<sup>-1</sup> treatment as a control; (0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 5.0 g L<sup>-1</sup> Ni) with six replications. In the first experiment there was an increase in nitrogen content and SPAD index, and the smaller Ni doses there was an increase in productivity. Regarding the physiological quality of seeds, germination and emergence rate increased linearly with increasing Ni doses without fungicide. However, when Ni was associated with pyraclostrobin the germination percentage showed a quadratic fit with increased germination to the dose of 40 g ha<sup>-1</sup> Ni. In the second experiment there was the naturally occurring powdery mildew (*Erysiphe diffusa*), and the application of Ni 60 g ha<sup>-1</sup> associated with 300ml c.p. ha<sup>-1</sup> fungicide reduced the severity of powdery mildew than 99%, maximum activity of the enzymes urease, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) were observed. In the third experiment in the 'in vitro' test, the application of Ni controlled urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi* germination, however in the field Ni was not effective in controlling asian soybean rust, and there was no significant difference in productivity. The combination of Ni and fungicide doses increased the concentration of hydrogen peroxide and lipid peroxidation, indicating the formation of reactive oxygen species in the leaf tissue. In all experiments was increased Ni content in the leaves and grains. There was synergistic effect of fungicides on the urease activity in smaller doses.

**Keywords:** Urea. Disease control. Soybean. *Glycine max*. Antioxidant enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

#### Papel fisiológico do níquel e relações com doenças fúngicas em plantas

<b>Figura 1</b>	- Sintomatologia de deficiência de níquel (Ni) em trifólios de soja ( <i>Glycine max</i> L. Merrill) cultivadas em condições controladas.....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	- Comparação entre folhas de pecã ( <i>Carya illinoensis</i> ) com sintomatologia de deficiência de níquel (Ni) (esquerda), denominadas popularmente com ‘orelha de rato’, e folhas com desenvolvimento normal (direita), em condições controladas.....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	- Distribuição do Ni nas plantas Mais de 50% do Ni fica retido nas raízes, e 80% do total retido na raiz fica localizado no cilindro vascular. O Ni no caule e folhas são localizados principalmente nos vacúolos, paredes celulares e tricomas epidérmicos associados a quelantes tais como: nicotianamina (NA), histidina (His), citrato, ácidos orgânicos e proteínas com várias funções importantes, incluindo permeases, metalotioneínas (MT), metalochaperonas e proteínas YS1-like (YSLs).....	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	- Atividade da enzima urease na recuperação do $\text{NH}_4^+$ no metabolismo do alantoína e ácido alantóico (A); recuperação do $\text{NH}_4^+$ pelo ciclo da ornitina (B).....	<b>28</b>
<b>Figura 5</b>	- Efeito do Ni na germinação de esporos do fungo <i>Fusicladosporium caryigenum</i> .....	<b>32</b>
<b>Figura 6</b>	- Efeito da concentração de Ni na incidência da ferrugem ( <i>Puccinia hemerocallidis</i> ) da Hemerocallis (A) e ferrugem da pecã ( <i>Fusicladosporium caryigenum</i> ) (B).....	<b>33</b>

### CAPÍTULO II

#### Níquel foliar na nutrição, atividade da urease e qualidade fisiológica de sementes de soja

<b>Figura 1</b>	- Dados climáticos indicando a temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura média e precipitação durante a execução do experimento no município de Chapadão do Sul-MS, Brasil.....	<b>55</b>
<b>Figura 2</b>	- Concentração de nitrogênio [A]; fósforo [B]; potássio [C]; cálcio [D], magnésio [E] e enxofre [F] em folha diagnose de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.....	<b>59</b>
<b>Figura 3</b>	- Concentração de boro [A], cobre [B], ferro [C], manganês [D], zinco [E] e níquel [F] em folha diagnose de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.....	<b>61</b>
<b>Figura 4</b>	- Concentração de níquel (Ni) no grão de soja [A], unidades SPAD [B], atividade da urease [C], produtividade [D], número	

	de vagens por planta [E] e número de grãos por vagem [F] de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.....	63
<b>Figura 5</b>	- Primeira contagem da germinação (PCG) [A], taxa de germinação (G) [B], taxa de emergência [C], condutividade elétrica [D], comprimento da plântula [E] e massa seca da plântula (S) [F] de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.....	64

### CAPÍTULO III

#### Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) em plantas de soja

<b>Figura 1</b>	- Dados climáticos de precipitação (mm), umidade relativa do ar (%) e temperatura mínima, média e máxima (°C) durante o desenvolvimento do experimento. O experimento foi instalado próximo à estação meteorológica da Fazenda Experimental de Pesquisa e Ensino da Universidade Estadual Paulista localizada no município de Selvíria-MS, Brasil.....	77
<b>Figura 2</b>	- Diagnóstico visual da severidade de incidência do oídio da soja em resposta a aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.....	85
<b>Figura 3</b>	- Eletromicrografia da conídia e hifa do oídio da soja em resposta a aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.....	86
<b>Figura 4</b>	- Porcentagem de severidade de incidência do oídio nos trifólios da soja em função da aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.....	88
<b>Figura 5</b>	- Atividade da urease (a) e concentração de ureia (b) no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	89
<b>Figura 6</b>	- Concentração de ácido chiquímico e atividade de enzimas antioxidativas no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida. (a) concentração de ácido chiquímico; (b) atividade da superóxido dismutase; (c) atividade da catalase, (d) atividade da peroxidase; (e) peroxidação lipídica e (f) concentração de peróxido de hidrogênio.....	92
<b>Figura 7</b>	- Teores foliares de nitrogênio e micronutrientes na soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	97
<b>Figura 8</b>	- Teores de nutrientes em grãos de soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	98
<b>Figura 9</b>	- Número de vagens e produtividade da soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	99

## CAPÍTULO IV

### Níquel no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em plantas de soja

<b>Figura 1</b>	- Dados climáticos de precipitação (mm), umidade relativa do ar (%) e temperatura mínima, média e máxima (°C) durante o desenvolvimento do experimento. O experimento foi instalado próximo à estação meteorológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, localizada em Londrina, Paraná, Brasil.....	<b>116</b>
<b>Figura 2</b>	- Avaliação de NDVI utilizando o aparelho GreenSeeker.....	<b>118</b>
<b>Figura 3</b>	- Porcentagem de germinação de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> in vitro sob diferentes concentrações de Ni e sob 10 ppm de picoxistrobina + ciproconazol.....	<b>125</b>
<b>Figura 4</b>	- Severidade de ferrugem avaliada nos estágios fenológicos R 5.4 (a) e R 5.5 (b) em plantas de soja, e índice de vegetação por diferença normalizada (NVDI) avaliados em 04 de março R5.5(c) e em 07 de março R5.5 (d) na área experimental em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	<b>126</b>
<b>Figura 5</b>	- Visão geral do experimento instalado no município de Londrina-PR. As manchas de coloração marrom ao lado direito é a desfolha causada pela ferrugem asiática.....	<b>127</b>
<b>Figura 6</b>	- Visão geral do terço-médio da planta demonstrando a perda de folhas. Testemunha (A); tratamento 40 g ha <sup>-1</sup> (B); tratamento 80 g ha <sup>-1</sup> (C); tratamento 100 g ha <sup>-1</sup> (D).....	<b>127</b>
<b>Figura 7</b>	- Atividade da urease (a) e concentração de ureia (b) no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	<b>130</b>
<b>Figura 8</b>	- Concentração de ácido chiquímico e atividade de enzimas antioxidativas no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida. (a) concentração de ácido chiquímico; (b) atividade da superóxido dismutase; (c) atividade da catalase, (d) atividade da peroxidase; (e) peroxidação lipídica e (f) concentração de peróxido de hidrogênio.....	<b>134</b>
<b>Figura 9</b>	- Teores foliares de ferro (a) e níquel (b) em função da aplicação de Ni.....	<b>138</b>
<b>Figura 10</b>	- Teores de nutrientes (a) potássio; (b) magnésio; (c) níquel em grãos de soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	<b>140</b>
<b>Figura 11</b>	- Índice SPAD em folhas de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.....	<b>141</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

#### Papel fisiológico do níquel e relações com doenças fúngicas em plantas

### CAPÍTULO II

#### Níquel foliar na nutrição, atividade da urease e qualidade fisiológica de sementes de soja

<b>Tabela 1</b>	- Correlação de Pearson entre as variáveis analisadas nesse estudo.....	<b>66</b>
-----------------	---	-----------

### CAPÍTULO III

#### Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) em plantas de soja

<b>Tabela 1</b>	- Correlação de Pearson entre as variáveis analisadas nesse estudo.....	<b>101</b>
-----------------	---	------------

### CAPÍTULO IV

#### Níquel no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em plantas de soja

<b>Tabela 1</b>	- Tratamentos aplicados para avaliação dos efeitos “in vitro” de sulfato de níquel sobre <i>P. pachyrhizi</i> . Londrina – PR, 2016.....	<b>114</b>
<b>Tabela 2</b>	- Correlação de Pearson entre as variáveis analisadas nesse estudo.....	<b>143</b>

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

#### Papel fisiológico do níquel e relações com doenças fúngicas em plantas

3	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	18
4	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	20
4.1	SINTOMATOLOGIA DE DEFICIÊNCIA DE NI EM PLANTAS.....	20
4.2	ABSORÇÃO, ASSIMILAÇÃO E ACÚMULO DE NI EM PLANTAS.....	22
4.3	INTERAÇÃO DO NI COM OUTROS NUTRIENTES.....	25
4.4	PAPEL FISIOLÓGICO DO NI EM PLANTAS.....	26
4.5	NÍQUEL E ESTRESSE ANTIOXIDATIVO EM PLANTAS.....	29
4.6	NÍQUEL NO CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS.....	31
4.7	PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS DA SOJA.....	34
4.8	OÍDIO ( <i>ERYSIPHE DIFFUSA</i> ).....	36
4.9	FERRUGEM ASIÁTICA ( <i>PHAKOPSORA PACHYRHIZI</i> ).....	37
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	39

### CAPÍTULO II

#### Níquel foliar na nutrição, atividade da urease e qualidade fisiológica de sementes de soja

3	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	52
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	53
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	53
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	54
4.3	INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	54
4.4	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	55
4.4.1	<b>Análise utricional.....</b>	55
4.4.2	<b>Índice de clorofila.....</b>	56
4.4.3	<b>Atividade da urease (EC 3.5.1.5).....</b>	56
4.4.4	<b>Avaliações de Crescimento e Produtividade.....</b>	56
4.4.5	<b>Qualidade Fisiológica De Sementes.....</b>	57
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	57
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	67
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	68

### CAPÍTULO III

#### Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) em plantas de soja

3	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	75
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	76
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	76
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	77
4.3	INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	78
4.4	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	79
4.4.1	<b>Avaliações de crescimento e produtividade.....</b>	79
4.4.2	<b>Avaliação de severidade de doença.....</b>	79
4.4.3	<b>Miscroscopia eletrônica de varredura.....</b>	79
4.4.4	<b>Análise nutricional.....</b>	79
4.4.5	<b>Índice de clorofila.....</b>	80
4.4.6	<b>Análises enzimáticas.....</b>	80
4.4.6.1	<i>Coleta do material.....</i>	80
4.4.6.2	<i>Atividade da urease (EC 3.5.1.5).....</i>	80
4.4.6.3	<i>Conteúdo de peróxido de hidrogênio.....</i>	81
4.4.6.4	<i>Peroxidação lipídica.....</i>	81
4.4.6.5	<i>Determinação de ureia.....</i>	81
4.4.6.6	<i>Determinação de ácido chiquímico.....</i>	82
4.4.6.7	<i>Extração de proteínas e enzimas antioxidantes.....</i>	82
4.4.6.8	<i>Determinação de proteínas.....</i>	82
4.4.6.9	<i>Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....</i>	83
4.4.6.10	<i>Catalase (CAT, 1.11.1.6).....</i>	83
4.4.6.11	<i>Peroxidase (EC. 1.11.1.7).....</i>	83
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	84
5.1	EFEITO DO NI NA SEVERIDADE DO OÍDIO.....	84
5.2	ATIVIDADE DA UREASE E CONCENTRAÇÃO DE UREIA.....	87
5.3	TEOR PROTEICO E ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS.....	91
5.4	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	95
5.5	PARÂMETROS DE PRODUTIVIDADE.....	99
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	102
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	103

### CAPÍTULO VI

#### Níquel no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em plantas de soja

3	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	112
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	114
4.1	EXPERIMENTO 1 - EFEITO DO NI NA GERMINAÇÃO DE UREDINIÓSPORO DE <i>P. PACHYRHIZI</i> .....	114
4.2	EXPERIMENTO 2. APLICAÇÃO DE NI ASSOCIADO OU NÃO AO FUNGICIDA NA SEVERIDADE DA	

	FERRUGEM ASIÁTICA E METABOLISMO ANTIOXIDANTE NA CULTURA DA SOJA.....	115
4.2.1	Caracterização da área experimental.....	115
4.2.2	Delineamento experimental e tratamentos.....	116
4.2.3	Instalação e condução do experimento.....	117
4.2.4	Variáveis analisadas.....	117
4.2.4.1	<i>Avaliações de crescimento e produtividade.....</i>	117
4.2.4.2	<i>Avaliação de severidade de doença.....</i>	117
4.2.4.3	<i>Índice de vegetação por diferença normalizada.....</i>	118
4.2.4.4	<i>Análise nutricional.....</i>	118
4.2.4.5	<i>Índice de clorofila.....</i>	119
4.2.4.6	<i>Análises enzimáticas.....</i>	119
4.2.4.6.1	<i>Coleta do material.....</i>	119
4.2.4.6.2	<i>Atividade da urease (EC 3.5.1.5).....</i>	119
4.2.4.6.3	<i>Conteúdo de peróxido de hidrogênio.....</i>	120
4.2.4.6.4	<i>Peroxidação lipídica.....</i>	120
4.2.4.6.5	<i>Determinação de ureia.....</i>	121
4.2.4.6.6	<i>Determinação de ácido chiquímico.....</i>	121
4.2.4.6.7	<i>Extração de proteínas e enzimas antioxidantes.....</i>	121
4.2.4.6.8	<i>Determinação de proteínas.....</i>	122
4.2.4.6.9	<i>Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....</i>	122
4.2.4.6.10	<i>Catalase (CAT, 1.11.1.6).....</i>	122
4.2.4.6.11	<i>Peroxidase (EC. 1.11.1.7).....</i>	123
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	123
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	123
5.1	EFEITO DO NI NA GERMINAÇÃO E SEVERIDADE DA FERRUGEM.....	123
5.2	ATIVIDADE DA UREASE E CONCENTRAÇÃO DE UREIA.....	128
5.3	TEOR PROTEICO E ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS.....	131
5.4	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	136
5.5	ÍNDICE DE CLOROFILA.....	140
5.6	PARÂMETROS DE PRODUTIVIDADE.....	141
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	144
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	145

## CAPÍTULO I

### Papel fisiológico do níquel em plantas e controle de doenças fúngicas

#### RESUMO

O níquel (Ni) é um micronutriente para as plantas. É componente estrutural da urease, enzima que catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono e amônia. No caso das espécies leguminosas, o Ni exerce influência direta no processo de fixação biológica de nitrogênio por ser constituinte da enzima hidrogenase. No processo de fixação biológica do nitrogênio, a enzima nitrogenase realiza a quebra da tripla ligação da molécula do gás nitrogênio, formando amônia e hidrogênio. Além disso, baixas concentrações de Ni ativa o sistema antioxidativo pelas enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase. Isso permite que as concentrações endógenas de peróxido de hidrogênio e acúmulo de malondialdeído diminua no tecido foliar. Desta forma, são formadas baixas taxas de peroxidação lipídica na membrana celular devido a não formação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar da planta. O Ni ativa o metabolismo secundário de plantas como a síntese de fitoalexinas. A urease não é responsável somente pela reciclagem de nitrogênio na célula vegetal, mas apresenta também papel antifúngico. A aplicação foliar de soluções com baixa concentração de Ni pode controlar doenças fúngicas como oídio e ferrugem em plantas. O Ni ativa o sistema antioxidativo, metabolismo secundário, além de impedir a germinação de uredíniosporo e multiplicação de hifas de diversos fungos. Nessa revisão serão discutidos os mecanismos de assimilação e transporte e papel fisiológico do Ni na nutrição mineral de plantas, sistema antioxidativo e no controle de doenças fúngicas nas plantas.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidativas. Metabolismo secundário. Micronutrientes. Urease. Estresse oxidativo.

## Physiological roles of nickel in higher plants and fungal disease control

### ABSTRACT

Nickel (Ni) is a micronutrient for higher plants. It is a structural component of urease enzyme that catalyzes the degradation of urea into ammonia and carbon dioxide in plant cell tissues. Nickel plays a direct influence on biological nitrogen fixation process because it is constituent of hydrogenase enzyme. During the biological nitrogen fixation process in legume plants, the nitrogenase enzyme breaks down the triple nitrogen bond into ammonia and hydrogen. Moreover, low concentrations of Ni supply to plants can elicits antioxidant metabolism by acting of superoxide dismutase, catalase and peroxidase enzymes. These antioxidant enzymes consume endogenous hydrogen peroxide decreasing the malondialdehyde (lipid peroxidation) accumulation in plant cell membranes. In addition, Ni acts on secondary metabolism of plants such as phytoalexin biosynthesis. The urease enzyme shows antifungal properties in several types of crops. Foliar spray application using solutions with low Ni concentration can fight against fungal diseases such as powdery mildew and rust in several types of plants. Nickel activates the antioxidant system, secondary metabolism, and fight against fungal diseases by inhibition of urediniospore germination and fungal hyphae multiplication. In this review will be discussed the Ni assimilation, transport, and the physiological role of Ni focused on mineral plant nutrition, antioxidative metabolism and fungal disease control in plants.

**Keywords:** Antioxidative enzymes. Secondary metabolism. Micronutrient. Urease. Oxidative stress.

### 3 INTRODUÇÃO

O níquel teve sua essencialidade comprovada, por ser componente da enzima urease (EC 3.5.1.5., ureia amidohidrolase), satisfazendo os critérios diretos (DIXON et al. 1975), e indiretos ao demonstrar que soja (ESKEW; WELCH; CARY, 1983), feijão (*Vigna unguiculata*) (ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984) e cevada (BROWN; WELCH; CARY, 1987), não completam seu ciclo de vida na ausência do metal, adicionando o Ni a lista de micronutrientes. A urease ocorre em duas formas isoenzimáticas nas plantas de soja, uma de alta expressão denominada "urease embrião-específica", sintetizada na semente, e a outra, a "urease ubíqua", sintetizada nos demais tecidos da planta, desempenhando importante papel no metabolismo do nitrogênio (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015). Recentemente foi descoberto um novo gene codificador de urease designado Eu5, porém os autores sugerem que a enzima codificada por esse gene não está envolvida no metabolismo do Ni nas plantas, mas sim em outras funções ainda não determinadas (WIEBKE-STROHM et al., 2016).

No caso das espécies leguminosas, o Ni exerce influência direta no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), por ser constituinte da enzima hidrogenase (SELLSTEDT; SMITH, 1990; LAVRES; FRANCO; DE SOUSA CÂMARA, 2016), e também pelo fato da enzima urease beneficiar a simbiose com *Bradyrhizobium japonicum* (MEDEIROS-SILVA et al., 2014). Além disso, as leguminosas apresentam duas rotas adicionais de produção de ureia: o catabolismo de purina, conduzindo à formação de ureídeos, tais como a alantoína e ácido alantóico, e da hidrólise do ácido alantóico em glioxilato e ureia na reação catalisada por allantoicase (WELCH, 1981; WALKER et al., 1985; ZONIA et al., 1995).

Pulverizações foliares com Ni em baixas doses, também aumentam a tolerância ao estresse biótico e abiótico nas plantas, uma vez que esse micronutriente é elicitador do metabolismo antioxidante elevando a atividade de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, entre elas a catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), que protegem as células das plantas contra radicais livres (GONZÁLEZ et al., 2015), e de alguns metabólitos secundários originados na rota do ácido chiquímico, como flavonoides, antocianinas e fenóis (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016), devido ao seu efeito sobre a via do ácido chiquímico, amenizando também efeitos de deriva da aplicação do herbicida (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013b).

O Ni tem efeito direto ou indireto sobre microrganismos que promovem doenças em plantas, sendo especialmente efetivo nas doenças causadas por fungos (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007; REIS et al., 2014). Assim, sintomas causados por doenças em plantas de feijão caupi (GRAHAM et al., 1985), *Hemerocallis* (REILLY; CRAWFORD; BUCK, 2005), arroz (WOOD; REILLY, 2007), amendoim (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007), pecã (WOOD et al., 2011) e soja (QUEIROZ, 2012). O efeito indireto foi observado quando plantas mutantes sem genes para produção da enzima urease apresentaram maior incidência de sintomas do que plantas normais (WIEBEK-STRHOM et al., 2012).

Apesar das várias estratégias de manejo, o uso de fungicidas ainda constitui a principal ferramenta no controle das doenças em plantas de soja (GODOY et al., 2015a). No entanto, algumas moléculas de fungicidas tem se tornado menos eficientes no controle de doenças, de forma que alguns estudos tem avaliado novamente o uso de velhos fungicidas multi-sítio, como mancozeb e sulfato de cobre, que apresentam baixo risco de resistência (GODOY et al., 2016).

Dessa maneira, o Ni pode vir a ser uma alternativa no controle de doenças fúngicas, realizando papel similar ao de fungicidas multi-sítio. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do Ni, associado ou não ao controle químico com fungicida, de doenças na cultura da soja com ênfase no estado nutricional e no estresse antioxidativo, e qualidade de sementes.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 SINTOMATOLOGIA DE DEFICIÊNCIA DE NI EM PLANTAS

A deficiência de níquel inibe a atividade da enzima urease fazendo com que ocorra acúmulo de ureia em níveis tóxicos nas folhas, ocasionando o aparecimento de manchas necróticas, impedindo o desenvolvimento da cultura e em casos mais severos provocando até a morte das plantas (REIS et al., 2014). Em leguminosas e outras dicotiledôneas são observados sintomas de necrose nas pontas dos folíolos (Figura 1) (ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984), enquanto que em monocotiledôneas são observados sintomas de clorose nas folhas, similar a induzida por deficiência de ferro, incluindo clorose internerval e necrose irregular nas folhas jovens (BROWN; WELCH; CARY, 1987).

**Figura 1-** Sintomatologia de deficiência de níquel (Ni) em trifólios de soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivadas em condições controladas.



Fonte: Eskew, Welch e Cary (1983).

Como consequência da deficiência de níquel, o metabolismo de ureídeos, aminoácidos e de ácidos orgânicos é perturbado, fazendo com que os ácidos oxálico e málico se acumulem (BAI; REILLY; WOOD, 2006), juntamente com os níveis tóxicos de ureia, ocasionando os sintomas de manchas necróticas associados a deficiência de Ni (MALAVOLTA; MORAES, 2007)

Por outro lado, a aplicação foliar de Ni ou sua adição a solução nutritiva ameniza sintomas foliares de toxicidade causados pelo acúmulo de ureia, como observado em plantas de soja (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013a) tomate (TAN; IKEDA; ODA, 2000) e colza (ARKOUN et al. 2013).

**Figura 2-** Comparação entre folhas de pecã (*Carya illinoensis*) com sintomatologia de deficiência de níquel (Ni) (esquerda), denominadas popularmente com ‘orelha de rato’, e folhas com desenvolvimento normal (direita), em condições controladas.



Fonte: Bai, Reilly e Wood (2006).

Plantas cultivadas com privação de Ni também produzem sementes com baixo índice de germinação, e plântulas com crescimento reduzido. Esse quadro é revertido com a adição de Ni a solução de crescimento dessas sementes (ESKEW; WELCH; CARY, 1983; BROWN; WELCH; CARY, et al., 1987). Entretanto, o conteúdo de Ni na semente tem maior influência sobre a germinação e vigor de plântulas, sendo capaz inclusive de evitar sintomas de toxidez pela aplicação foliar de ureia, de forma que a aplicação de Ni não substitui o conteúdo de reserva da semente (ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013b). Em condições de cultivo a campo, foram relatadas apenas duas espécies que apresentam sintomas de deficiência de Ni,

pecã, que apresenta sintomas conhecido como “orelha-de-rato” apresentado na Figura 2 (WOOD; REILLY; NYCZEPIR, 2006) e *Betula nigra* (RUTER, 2005). Na maioria das espécies de plantas, raramente é observada a deficiência de Ni, isso porque a quantidade exigida pelas culturas desse metal é muito baixa, e o limite entre as concentrações adequadas e as tóxicas é grande em comparação com outros metais pesados (KÜPPER; KRONECK, 2007).

#### 4.2 ABSORÇÃO, ASSIMILAÇÃO E ACÚMULO DE NI EM PLANTAS

O níquel é absorvido pelas plantas principalmente através das raízes, sendo que essa absorção pode ocorrer tanto por transporte ativo como por transporte passivo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011), dependendo da concentração de Ni na solução (TEMP, 1991).

O Ni também pode ser absorvido via foliar, como apontado por Yusuf et al. (2011), em que a aplicação foliar do radioisótopo  $^{63}\text{Ni}$  em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.), revelou que 36% do Ni foi translocado aos demais órgãos. Tendência similar foi observada também em folhas de aveia (*Avena sativa* L.), soja e tomate (*Lycopersicon lycopersicum* L.) pulverizadas com solução de sais de Ni. Em ambientes de condições de alta poluição do ar por Ni, foi observada absorção do elemento pelas folhas de *Betula pubescens* subsp. *czerepanovi*, sendo a concentração de Ni nas folhas superior para absorção foliar, quando esta foi comparada a absorção via solo (KOZLOV et al., 2000).

A forma catiônica,  $\text{Ni}^{2+}$ , é mais prontamente absorvida, e mais tóxica para as plantas do que as formas complexadas de Ni (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011), como quelatos de ácidos orgânicos ou metalóforos (REIS et al., 2014). Porém o Ni apresenta também outras 4 valências, 0, 1+, 3+ e 4+, que não são absorvidas pelas plantas (LIU; SIMONNE; LI, 2011).

O transporte ativo de  $\text{Ni}^{2+}$  quelatizado também é possível, e ocorre através de proteínas que se ligam especificamente com  $\text{Ni}^{2+}$ , em um sistema de transporte de proteínas de alta-afinidade, através de permeases (HoxN - high-affinity nickel transport protein), metalotenas (MT) e metalocaperones (CHEN; HUANG; LIU, 2009).

Dentro da planta o níquel pode ser translocado tanto via apoplasto quanto via simplasto, isto pois o Ni pode se acumular tanto na parede celular quanto em protoplastos (CATALDO et al., 1988; TEMP, 1991; KRAMER et al., 1997; SAGNER et al., 1998; ZELLER; FELLER, 1998). O transporte do níquel a longas distâncias dentro da planta pode envolver tanto o xilema quanto o floema (ZELLER; FELLER, 1998). No floema a mobilidade

é alta, sendo que na senescência, até 70% do níquel acumulado na parte aérea pode ser deslocado para as sementes (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978).

Além de sua forma iônica, o Ni pode ser transportado ligado à proteínas específicas e complexado com ligantes metálicos como nicotinamida (NA), histidina (His) e ácidos orgânicos, com citrato e malato e peptídeos (CATALDO et al., 1988; HOMER et al., 1991; TEMP, 1991; KRAMER et al., 1996; PERSANS et al., 1999; KRAMER, 2000; CHEN; HUANG; LIU, 2009; WHITE 2012), como demonstrado na Figura 3, resultando em uma maior mobilidade desse micronutriente no xilema (WHITE, 2012). Sem a formação de quelatos, o movimento do Ni é severamente retardado devido à elevada CTC na parede celular do xilema (REIS et al., 2014). No floema, o Ni é primeiramente associado a ácidos orgânicos e aminoácidos (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1999; BROWN, 2006).

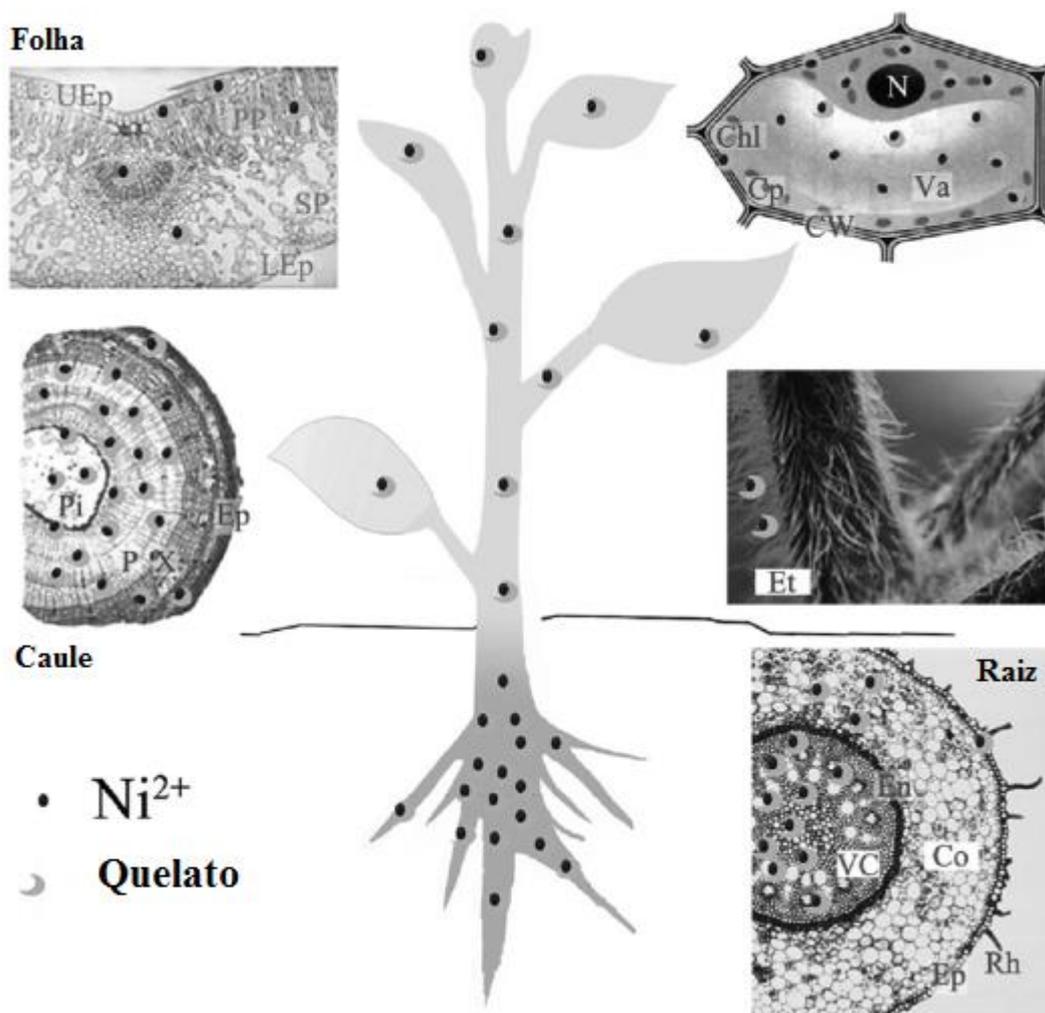
Várias espécies de plantas incluem também complexos de Ni com água  $Ni(H_2O)_6^{2+}$  (LEE et al., 1977; KERSTEN et al., 1980), bem como, complexos com asparagina (WHITE, 2012) e glutatona (FREEMAN et al., 2004; NOCTOR et al., 2012; TEZOTTO, 2015). Ao ser quelatizado, o Ni pode ser ligado ao citossol, a nível intracelular, ou, a compartimentos subcelulares, para ser transportado, translocado e acumulado dentro da planta (CHEN; HUANG; LIU, 2009).

Espécies de plantas variam em sua capacidade de acumular metais pesados. Um alto acúmulo de metais pesados e sua distribuição nos diversos órgãos dependem das características morfofisiológicas de cada planta (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006).

De forma geral, as espécies de plantas são classificadas em três grupos: 1. As acumuladoras, que estocam metais nos brotos sob alta ou baixa concentração de metal no solo; 2. As indicadoras, que a concentração de metal na planta refletem a concentração do metal no ambiente; 3. As exclusoras, que restringem a transferência dos metais pesados para os brotos, independente de quão alta esteja a concentração no ambiente e nas raízes (BAKER, 1981; SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006).

A maioria das espécies pertencem ao grupo das exclusoras. Assim, o Ni fica predominantemente acumulado nas raízes de *Zea mays*, *Typha latifolia*, *Alyssum montanum*, *Thlaspi arvense*, *Glycine max*, *Avena sativa*, *Cyperus difformis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Digitaria sanguinalis*, *Triticum aestivum* e *Hordeum vulgare* (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006). No entanto, quando o acúmulo de Ni excede um limite característico, os mecanismos de desintoxicação da planta se torna menos eficiente. Como resultado, o controle de entrada de metais para as brotações é perdido, e a planta passa a perecer (SEREGIN; IVANOV, 2001).

**Figura 3-** Distribuição do Ni nas plantas. Mais de 50% do Ni fica retido nas raízes, e 80% do total retido na raiz fica localizado no cilindro vascular. O Ni no caule e folhas são localizados principalmente nos vacúolos, paredes celulares e tricomas epidérmicos associados a quelantes tais como: nicotianamina (NA), histidina (His), citrato, ácidos orgânicos e proteínas com várias funções importantes, incluindo permeases, metalotioneínas (MT), metalochaperonas e proteínas YS1-like (YSLs).



Legenda: parede celular (CW), cloroplastos (Chl), córtex (Co), citoplasma (Cp), endoderme (En), tricoma epitelial (Ep), epiderme abaxial (LEp), núcleo (N), parênquima paliádico (PP), floema (P), feixes vasculares (Pi), raízes pelíferas (Rh), parênquima esponjoso (SP), epiderme adaxial (UEp), vacúolos (Va), cilindro vascular (VC), xilema (X).

Fonte: Chen, Huang e Liu (2009).

Em plantas de soja, mais de 50% do Ni absorvido fica retido nas raízes quando ocorre absorção radicular (Figura 3) (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978). Alguns autores atribuem esse efeito ao sequestro nos sítios de troca de cátions no parênquima das células que formam a parede do xilema, bem como a imobilização do metal em vacúolos nas raízes (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006; CHEN; HUANG; LIU, 2009). Além disso, mais de

80% do Ni nas raízes está localizado no cilindro vascular, enquanto que menos de 20% está presente no córtex (Figura 3) (CHEN; HUANG; LIU, 2009).

De maneira geral, o Ni presente nos ramos e folhas está localizado em vacúolos, parede celular e em tricomas na epiderme, associados com citrato, malato e malonato (CHEN; HUANG; LIU, 2009). A concentração de Ni em plantas crescendo em solos não contaminados varia entre 0,05 a 5,0 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca (WELCH, 1981; BROOKS, 1980), enquanto que teores considerados normais que variam até 10 mg kg<sup>-1</sup> de Ni (GERENDÁS et al., 1999).

#### 4.3 INTERAÇÃO DO NI COM OUTROS NUTRIENTES

Na presença de Ni, o conteúdo de nutrientes minerais em órgãos de plantas pode aumentar, diminuir, ou permanecer mesmo (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006). Barsukova e Gamzikova (1999), aplicando altas concentrações de Ni, constataram que o conteúdo de ferro, manganês e zinco nas folhas diminuíram durante a fase de perfilhamento em *Triticum aestivum*, enquanto que nas raízes apenas o conteúdo de manganês diminuiu. Já, um aumento no teor de Ni de 50 a 200 mg kg<sup>-1</sup> de solo diminuiu os teores de cobre e magnésio na cariopse, e de magnésio e cálcio nos brotos. Em experiências com plantas de azevém Khalid e Tinsley (1980) demonstraram que o teor de ferro aumentou nos brotos submetidos à baixas concentrações de níquel, e diminuiu à concentrações mais elevadas, enquanto que os teores de zinco e manganês diminuíram na presença do Ni.

Um dos prováveis meios que afetam a absorção de macro e micronutrientes está na competição estabelecida entre Ni<sup>2+</sup> e outros cátions por locais de ligação comuns. Segundo Barsukova e Gamzikova (1999), tal mecanismo pode operar quando os raios iônicos têm tamanhos semelhantes, como a absorção de Mg<sup>2+</sup> (78 pm), Fe<sup>2+</sup> (82 pm) e Zn<sup>2+</sup> (83 pm) é diminuída na presença de Ni<sup>2+</sup> [raios iônicos em parênteses são do (EMSLEY, 1991)].

Ainda é desconhecido algum transportador específico para o íon Ni<sup>2+</sup> (GUERINOT, 2000; LI et al., 2001; REIS et al., 2014), no entanto, este processo pode empregar vários transportadores inespecíficos (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006; WHITE, 2012), e cada espécie pode utilizar diferentes mecanismos moleculares para a absorção de Ni e de outros metais (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006).

Alguns pesquisadores sugerem que Ni entre nas células vegetais através de canais de cálcio ativado (BOYD; MARTENS, 1998; EHLKEN; KIRCHNER, 2002). Trabalhando com plantas hiperacumuladoras de Ni, Boyd e Martens (1998) observaram um efeito sinérgico do

cálcio sobre a absorção de Ni em *Berkheya coddii*, em contra partida, Gabbrielli e Pandolfini (1984) demonstraram que cálcio reduziu a absorção de Ni por *Alyssum bertolonii*.

Estudos sugerem também que o Ni em sua forma solúvel pode ser absorvido também por transportadores de magnésio (NISHIDA et al., 2015). Membros de transportadores de magnésio da família MRS/MGT de *Arabidopsis* se mostraram ativos na absorção de Ni em levedura (LI et al., 2001; LI et al., 2008). Ademais, o magnésio inibe a absorção de Ni em algas, cevada e espinafre (NISHIDA et al., 2015). Por outro lado, em plantas de soja não foi relatada a mesma interação (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978).

O Ni ainda pode ser absorvido através do sistema de transporte de metais divalentes juntamente com zinco e cobre, sendo que a competitividade entre os três íons foi demonstrada em soja (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978), e cevada (KORNER; MOLLER; JENSÉN, 1987). Vários estudos tem mostrado que alguns transportadores Zrt/Irt membros da família ZIP são ativos no transporte de Ni (NISHIDA et al., 2015). White (2012) ainda sugere que transportadores da família ZIP também transportam manganês, permitindo que haja competição entre ele e o Ni.

Buscando elucidar o mecanismo subjacente de fitotoxicidade de Ni, Nishida et al. (2015), estudaram o mecanismo molecular de acúmulo de Ni utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo. Os autores observaram que o excesso de Ni é absorvido pelo sistema de absorção de ferro em *A. thaliana*, que está associada ao gene regulador de transporte de ferro 1 (IRT1- Iron-regulated transporter 1), que é homólogo aos transportadores da família ZIP, e determinado como principal transportador de absorção de Fe em raízes (NISHIDA et al., 2011). Além disso, Nishida et al. (2012), observaram que o excesso de acúmulo de Ni induz a expressão do gene IRT1, e está associado com uma desordem da homeostase de ferro, sugerindo que o acúmulo de Ni acelera ainda mais o sua absorção por IRT1.

Como um todo, o efeito inibitório dos íons metálicos na absorção e translocação de  $\text{Ni}^{2+}$  em raízes de brotos diminui na seguinte ordem:  $\text{Fe}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \gg \text{K}^+ > \text{Na}^+$  (TEMP, 1991). Segundo Cornu et al., (2014), a coordenação de distribuição e transporte obedece a constante de estabilidade da série Irving-Williams, que refere-se à estabilidade do cátion divalente às ligações terminais S-, N- e O-, que formaram moléculas orgânicas, na seguinte ordem  $\text{Mn (II)} < \text{Fe (II)} < \text{Co (II)}, \text{Ni (II)}, \text{Cu (II)} > \text{Zn (II)}$ .

#### 4.4 PAPEL FISIOLÓGICO DO NI EM PLANTAS

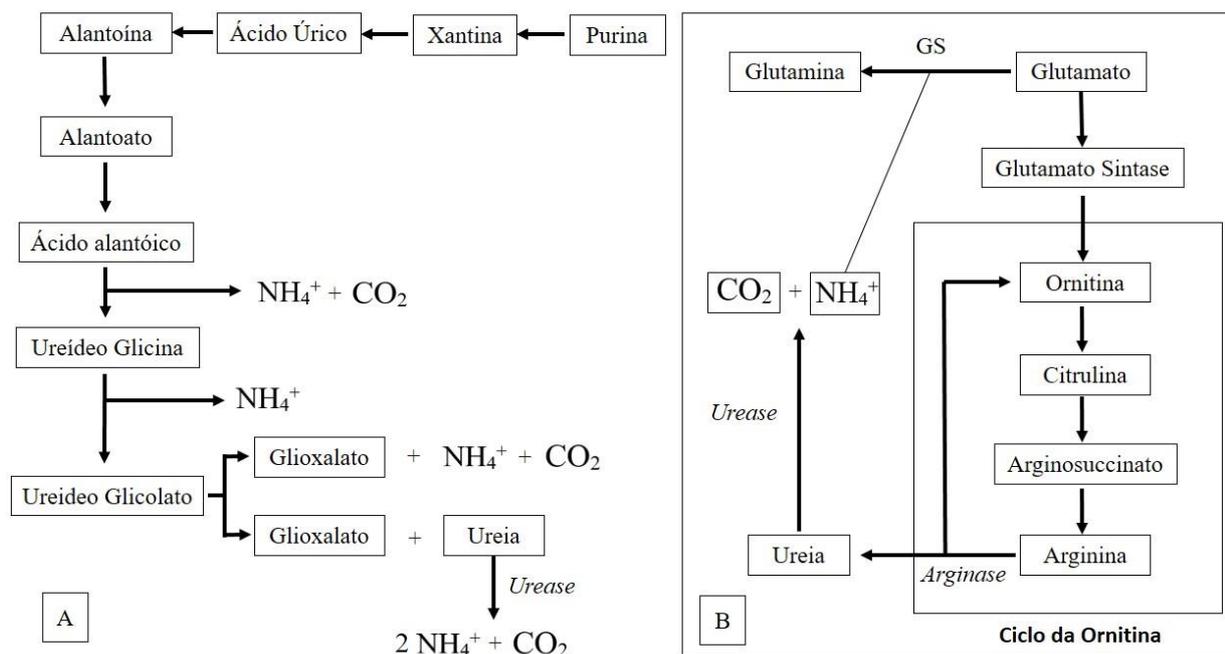
O Ni está envolvido no funcionamento de ao menos nove enzimas (LI; ZAMBLE, 2009) incluindo glyoxalases família (I), deformilase de péptido, redutase metil-COM e

ureases, e algumas superóxido dismutase e hidrogenases (KÜPPER; KRONECK, 2007; FRANCO; 2015). Sendo assim, o Ni atua em vários processos metabólicos importantes, incluindo ureolises, o metabolismo de hidrogênio, metano e biogênese acitogenesis (CHEN; HUANG; LIU, 2009).

A essencialidade do Ni nas plantas foi provada por Dixon et al. (1975), por preencher o critério direto de essencialidade, devido a sua participação na metaloenzima urease, enzima que catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e amônia (NH<sub>3</sub>), tendo sido primeiramente encontrada em sementes de *Canavalia ensiformis*. Os trabalhos de Eskew, Welch e Cary (1983), Eskew, Welch e Norvell (1984) e Brown et al. (1987) confirmaram sua essencialidade para as plantas superiores, ao demonstrar que plantas de soja, feijão e cevada apresentavam baixa atividade da urease em decorrência de deficiência de Ni, resultando em acúmulo de ureia no tecido foliar.

A urease ocorre em duas formas isoenzimáticas nas plantas de soja, uma de alta expressão denominada "urease embrião-específica", sintetizada na semente, e a outra, a "urease ubíqua", sintetizada nos demais tecidos da planta, desempenhando importante papel no metabolismo do nitrogênio (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015). Recentemente foi descoberto um novo gene codificador de urease designado Eu5, porém os autores sugerem que a enzima codificada por esse gene não está envolvida no metabolismo do Ni nas plantas, mas sim em outras funções ainda desconhecidas (WIEBKE-STROHM et al., 2016).

**Figura 4-** Atividade da enzima urease na recuperação do  $\text{NH}_4^+$  no metabolismo do alantóina e ácido alantóico (A) recuperação do  $\text{NH}_4^+$  pelo ciclo da ornitina (B) (BAI; REILLY; WOOD, 2006).



Legenda: GS – glutamina sintetase,  $\text{NH}_4^+$  – amônio,  $\text{CO}_2$  – dióxido de carbono.

Fonte: Reis et al. (2014).

A ureia, além de ser uma das principais fonte de nitrogênio entre os fertilizantes, também pode ser sintetizada pelas plantas. Em primeiro lugar, a ureia é produzida durante o passo terminal do ciclo da ornitina, como produto do catabolismo da arginina, como demonstrado na Figura 4-B, que é particularmente importante no processo de remobilização do nitrogênio durante a germinação de sementes e durante o processo de senescência, e está presente em todas as plantas superiores (WALKER et al., 1985; WITTE, 2011; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013a).

Plantas de soja e outras plantas da família Fabaceae ainda possuem duas vias adicionais de biossíntese da ureia: através do catabolismo de purina, conduzindo à formação de ureídeos, que compõem a principal forma de reserva para translocação de nitrogênio a partir de raízes em rebentos (via característica de leguminosas); e finalmente, um percurso adicional a partir de um aminoácido não proteico, a canavanina, encontrada apenas em feijão de porco e soja, e que exerce influência sobre síntese de glutamina (Figura 4-A); (WALKER et al., 1985; ZONIA; STEBBINS; POLACCO, 1995).

De maneira geral, aproximadamente metade do fluxo do nitrogênio na planta se dá através da ureia, o qual é reciclado somente pela ação da enzima urease (POLACCO; HOLLAND, 1993). Arkoun et al. (2013), estudando a influência do Ni e de um inibidor da

urease em plantas de colza, com e sem fornecimento de ureia, verificaram que a ausência de Ni e a inibição da atividade da enzima urease afetaram diretamente o metabolismo do nitrogênio nas plantas, reduzindo a atividade das principais enzimas relacionadas à assimilação de nitrogênio no tecido vegetal, glutamina sintetase (GS), glutamato sintetase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH), concluindo a necessidade de fornecimento de Ni as plantas.

Foi proposto também que a urease, em combinação com a arginase, teriam papel na utilização das reservas proteicas das sementes durante a germinação, já que a ureia em plantas deriva primariamente da arginina, que é forma mais importante de transporte e armazenamento de N nos vegetais (POLACCO; HOLLAND, 1993).

No caso das espécies leguminosas, o Ni exerce influência direta no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), por ser constituinte da enzima hidrogenase (SELLSTEDT; SMITH, 1990). No processo de FBN a enzima nitrogenase realiza a quebra da tripla ligação da molécula do gás nitrogênio ( $N_2$ ), formando  $NH_3$  e hidrogênio ( $H_2$ ). A formação do  $H_2$ , pela nitrogenase, indica uso ineficiente de energia que poderia ser utilizada na fixação do  $N_2$ , além disso, as altas concentrações do  $H_2$  inibem a atividade da nitrogenase, reduzindo a eficiência da FBN. A enzima hidrogenase é capaz de reprocessar parte do gás hidrogênio ( $H_2$ ) em energia, realocando essa energia para a enzima nitrogenase, levando assim a uma recuperação energética (EVANS et al., 1987; LÓPEZ et al., 1983). Logo, o fornecimento adequado de Ni possibilita o aumento da atividade da enzima hidrogenase nos bacterióides, potencializando a nodulação e favorecendo a FBN (KLUCAS et al., 1983; URETA et al., 2005).

Evidências circunstanciais indicam que as espécies que transportam ureídeos, tais como nozes, possuem um requisito de Ni superiores à espécie de transporte de amida (WOOD; REILLY; NYCZEPIR, 2006), aumentando assim a possibilidade de que os transportadores e ureídeos podem possuir enzimas, além da urease, que necessitam de Ni para a ativação ou para aumento na atividade. Candidatos prováveis são uma ou mais enzimas que afetam o catabolismo de ureídeos (BAI; REILLY; WOOD, 2006).

#### 4.5 NÍQUEL E ESTRESSE ANTIOXIDATIVO EM PLANTAS

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é relativamente não reativo no seu estado fundamental, mas a produção de espécie reativas de oxigênio (ERO), tais como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ) e oxigênio singleto ( $O_2^1$ ), é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. Em condições de crescimento normais, a produção de

EROS em células ocorre a uma taxa baixa; No entanto, fatores ambientais adversos que perturbam a homeostase celular aumentar a produção de EROS, levando ao estresse oxidativo (GOMES-JUNIOR et al., 2006; THAKUR et al., 2013). A peroxidação lipídica, cujo principal produto é o malondialdeído (MDA), é indicadora efetiva do dano oxidativo sofrido pelas células (CHEN; HUANG; LIU, 2009; GONZÁLEZ et al., 2015).

As plantas respondem ao estresse oxidativo por meio da elevação da atividade das enzimas antioxidantes do ciclo ascorbato-glutationa, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a peroxidase (POD), que protegem as plantas dos danos oxidativos (DAS, et al., 1978; SCHICKLER; CASPI, 1999; PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992; SEREGIN; IVANOV, 2001). A primeira enzima a agir é a SOD que é responsável por dismutar o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em formas menos tóxicas  $H_2O_2$  e  $O_2$  para a planta. Em seguida CAT e POD são responsáveis por transformar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (THAKUR; SOHAL, 2013).

A atividade das enzimas antioxidantes podem variar de acordo com a duração do tratamento e do tipo de estresse, e entre espécies e partes de plantas (CHEN; HUANG; LIU, 2009). Aplicando Ni em uma concentração de 0,5 mM Gomes-Junior et al. (2006) obteve aumento nas atividades de SOD, CAT e POD em células de cafeeiro, enquanto que a mesma dose em mudas de *Cajanus cajan* aumentou as atividades de SOD e POD e diminuiu a atividade de CAT (RAO; SRETTY, 2000), e em folhas de repolho reduziu as atividades de CAT e POD (PANDEY; SHARMA, 2002).

Para doses superiores, plantas de água-pé apresentaram aumento nas atividades de SOD, CAT e POD, sendo que este aumento nas atividades das enzimas antioxidantes foi acompanhado de redução na concentração de MDA (GONZÁLEZ et al., 2015). Já em plantas de soja a aplicação de 2 mM de Ni, o aumentou as atividades de SOD e CAT, porém reduziu a atividade de POD, e aumentou a produção de  $H_2O_2$  e a concentração de MDA (SIRHINDI et al., 2015).

Assim, em condições ideais o Ni é considerado um elicitador do mecanismo antioxidativo das plantas, elevando as atividades das enzimas antioxidantes (REIS et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2015), aumentando a tolerância ao estresse biótico e abiótico nas plantas (THAKUR; SOHAL, 2013).

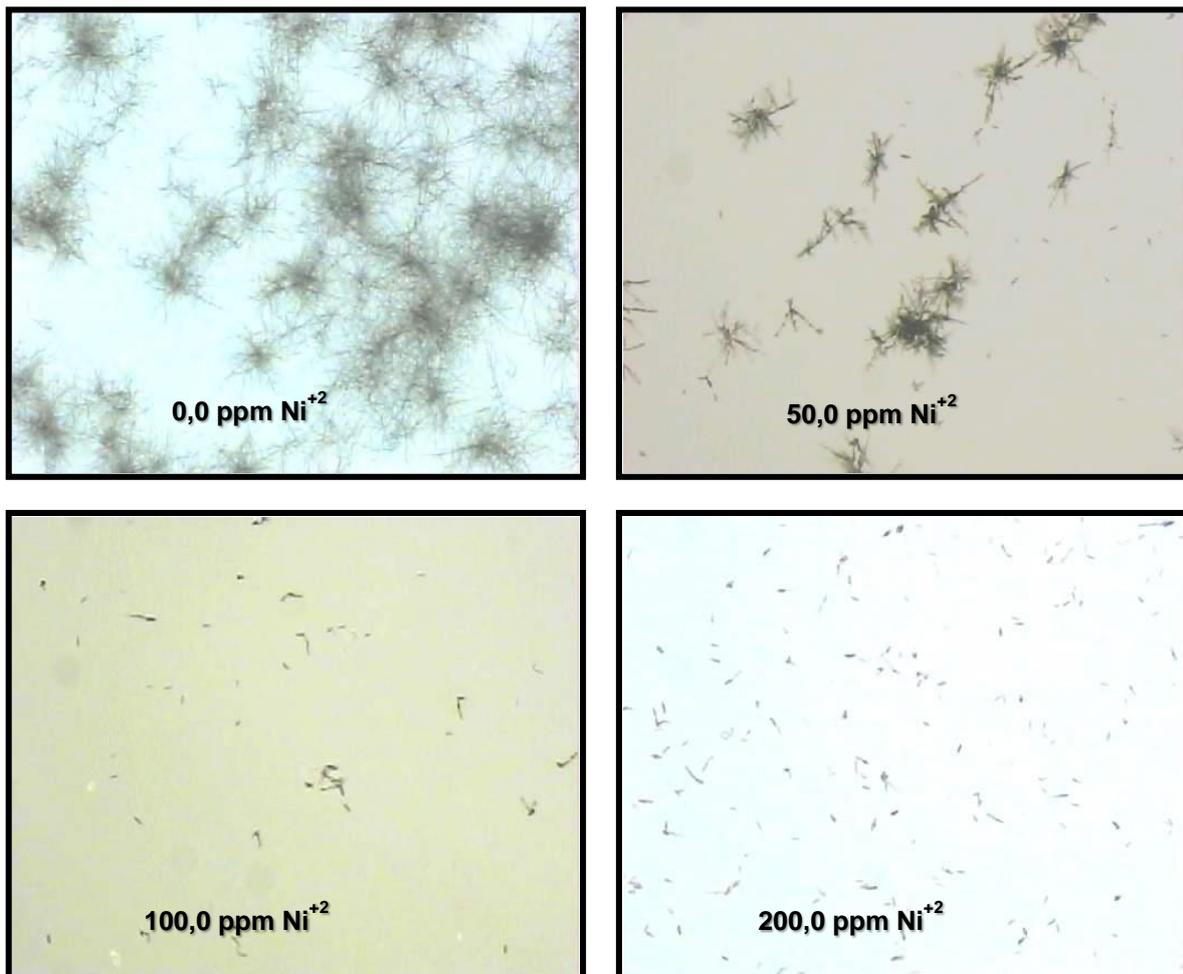
Foi demonstrado também que o Ni impede o acúmulo de ácido chiquímico causado pela aplicação de glifosato em plantas de trigo (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013a), e que em plantas de soja resistentes o acúmulo de ácido chiquímico nos nódulos foi acompanhado de deficiência de Ni nas folhas (ZOBIOLE et al., 2010).

O ácido chiquímico é um importante intermediário no metabolismo das plantas, sendo responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (COLE, 1985), assim, além de estar envolvido na síntese proteica, o ácido chiquímico também é uma molécula chave na biossíntese de vários metabólitos secundários como flavonóides, antocianinas, fenóis, ligninas, derivados indol e vários alcaloides aromáticos que são importantes no metabolismo de defesa das plantas, incluindo a defesa não enzimática contra o estresse antioxidativo (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016).

#### 4.6 NÍQUEL NO CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS

O Ni tem efeito direto ou indireto sobre microrganismos que promovem doenças em plantas, sendo especialmente efetivos nas doenças causadas por fungos (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007; REIS et al., 2014). O Ni é usado em pulverizações no controle de doenças fúngicas em cereais desde a década de 1930. Na época seu efeito era atribuído ao acúmulo tóxico para o fungo sobre a superfície foliar (MISHRA; KAR, 1974). Ensaios “in vitro” demonstraram o efeito direto do Ni na germinação de *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis*, fungos responsáveis respectivamente pela mancha-de-mycosphaerella e pela ferrugem do amendoim (KISHORE; PANDE; RAO, 2001), e *Phakopsora pachyrhizi* fungo causador da ferrugem asiática da soja (QUEIROZ, 2012) e para *Fusicladosporium caryigenum* causador da pústula ou sarna em pecã, como demonstrado na Figura 5 em que doses a partir de 50 ppm de Ni já demonstraram controle do fungo.

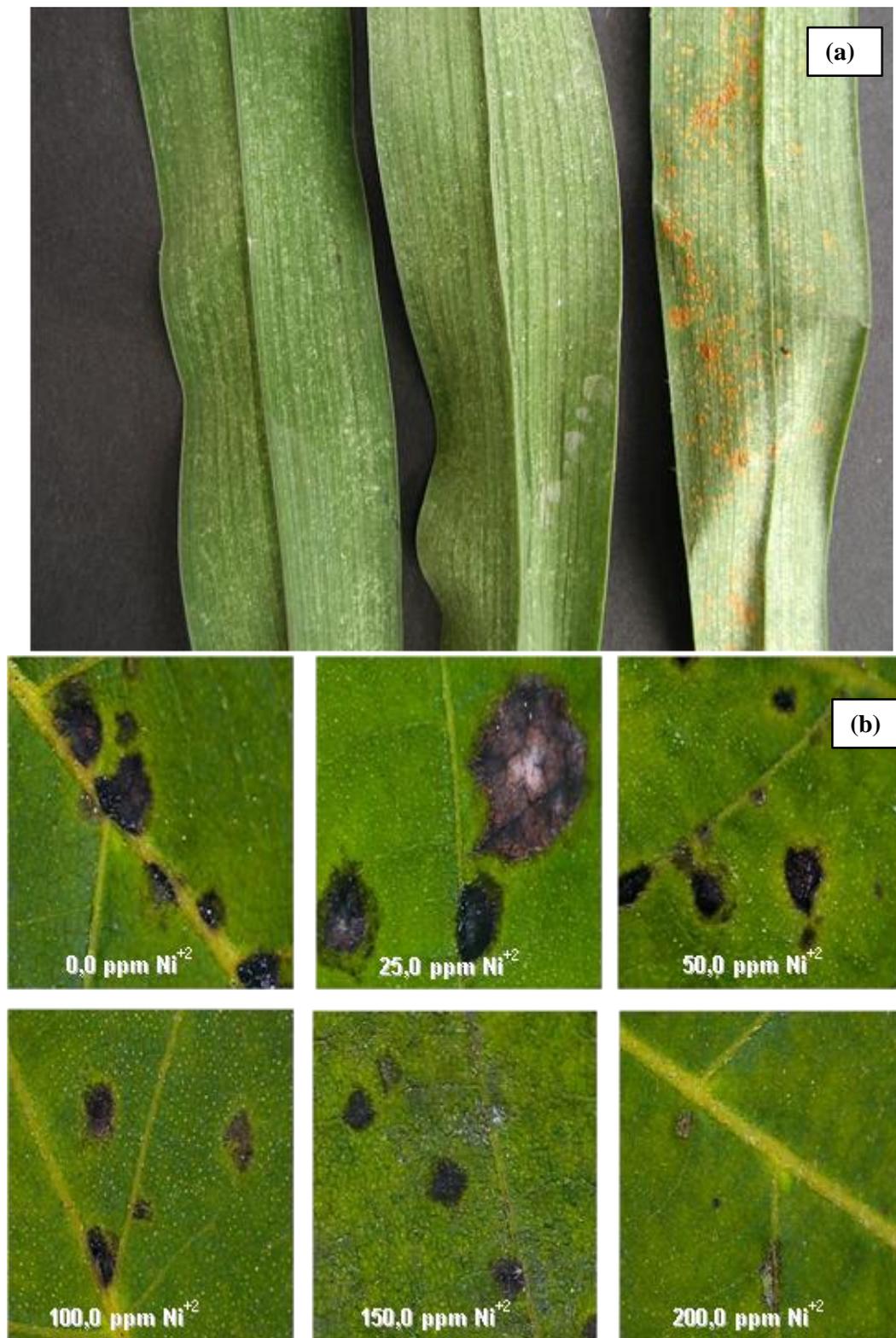
**Figure 5-** Efeito do Ni na germinação de esporos do fungo *Fusicladosporium caryigenum*.



Fonte: Cortesia do Dr. Bruce Wood "USDA - Department of Agriculture-Agricultural Research Service, USA".

A aplicação de sais de Ni reduziu a incidência de doenças causadas por *Puccinia hemerocallidis* em *Hemerocallis* (REILLEY; CRAWFORD; BUCK, 2005), *Fusicladosporium caryigenum* em pecã (WOOD et al., 2011), como demonstrado na Figura 6. Além disso, também reduziu a incidência de *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis* em amendoim (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007), *Helminthosporium oryzae* e *Pyricularia oryzae* em arroz (WOOD; REILLY, 2007), e *Phakopsora pachyrhizi* em soja (QUEIROZ, 2012).

**Figura 6-** Efeito da concentração de Ni na incidência da ferrugem (*Puccinia hemerocallidis*) da Hemerocallis (A) e ferrugem da pecã (*Fusicladosporium caryigenum*) (B).



Fonte: Cortesia do Dr. Bruce Wood "USDA - Department of Agriculture-Agricultural Research Service, USA".

Aplicando Ni via solo, Graham, Welch e Walker (1985) também obtiveram efeito do Ni no controle de doenças, sendo observada redução do número de lesões necróticas, causadas

por *Uromyces phaseoli* var. *vignae* em feijão caupi, sendo demonstrado que o Ni causa mudanças fisiológicas como aumento da atividade da urease que levam a redução nos danos causados por patógenos (GERENDÁS et al., 1999).

Recentemente foi demonstrado que a enzima urease está de fato relacionada a resistência das plantas as doenças, representando assim um dos possíveis efeitos indiretos do Ni sobre as doenças. Wiebek-Strhom et al. (2012) estudando soja transgênica com supressão do gene da urease, observaram lesões foliares mais evidentes de *Phakopsora pachyrhizi* no genótipo com gene de supressão quando comparadas às lesões encontradas nas plantas normais. Utilizando extratos proteicos contendo urease, os autores observaram ainda que *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp. e *Penicillium hergueli* apresentaram maior incidência quando a atividade da urease era baixa. O efeito antifúngico e pesticida da urease de algumas bactérias e plantas também são conhecidos, como é o caso da urease do feijão de porco (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

#### 4.7 PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS DA SOJA

A ocorrência de doenças é um dos fatores mais limitantes para obtenção de maiores produtividades da soja (BARBOSA; CENTURION; FERRAUDO, 2014). Em cada safra são necessárias três ou mais aplicações de fungicidas para controle de doenças, sendo gastos cerca de 2,0 bilhões de dólares por safra somente com o controle de doenças (GODOY et al., 2016; LANGENBACH et al., 2016). Ainda assim, as perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20% (GODOY et al., 2015a). Na ausência de controle são registradas perdas de 10 a 40%, no caso do oídio causado pelo fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA, 2013; PEREIRA, 2015), e de até 90%, como no caso da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (HARTMAN et al., 2015; GODOY et al., 2016).

Conquistando grandes mercados consumidores na ásia, europa e américa (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2016), a soja (*Glycine max* [L.] Merriell) é um dos principais produtos agrícolas brasileiros, representando 48,68% do total produzido no país, nos últimos 20 anos a área de cultivo de soja no Brasil triplicou (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB, 2016).

O Brasil é atualmente o segundo maior produtor de soja no mundo, e apesar de apresentar contínuos ganhos produtivos, devido a melhorias genéticas e de manejo (USDA, 2016), vários fatores bióticos e abióticos são responsáveis por limitarem o potencial produtivo

da cultura da soja, entre eles, as doenças foliares são consideradas um dos principais, pois afetam a qualidade de grãos, com perdas anuais estimadas em cerca de 15% a 20%, mesmo com o uso de defensivos (EMBRAPA, 2014; GODOY et al., 2015a).

De maneira geral a incidência de doenças varia bastante entre as regiões do Brasil, principalmente devido as variações nas condições edafoclimáticas. Além disso, programas de melhoramento no país buscam constantemente incorporar genes de resistência, quando possível, aos diferentes cultivares, de forma que algumas doenças logo deixam de ser um problema (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015), como no caso da mancha "olho-de-rã" (*Cercospora sojina*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*) e a pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv *glycines*) que foram controladas através da introgressão de genes de resistência (ALMEIDA et al., 2005).

A primeira doença da soja a ser controlada com o uso de fungicidas foi o oídio, que na safra de 1996/97 atingiu proporções epidêmicas na maioria das regiões produtoras do país. Posteriormente, o aumento da incidência das doenças de final de ciclo (*Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*), principalmente em função do cultivo intensivo e da ausência de rotação de culturas, também demandaram o registro de fungicidas (GODOY et al., 2015a).

Em 2001 foi identificado no Brasil o fungo causador da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), e logo após a primeira detecção, o fungo rapidamente se espalhou atingindo as principais lavouras produtoras de soja (YORINORI et al., 2005). Considerada a doença mais agressiva da soja, se não controlada as perdas podem atingir 90% (HARTMAN et al., 2015; GODOY et al., 2016).

Com o surgimento da ferrugem o uso de fungicidas foi intensificado no país, e outras medidas tiveram que ser adotadas, como o vazio sanitário que visa quebrar o ciclo contínuo da doença, e retardar sua ocorrência no início da safra (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015; LANGENBACH et al., 2016). Cultivares resistentes, apesar de surgirem no Brasil em 2009, nem sempre estão disponíveis para todas as localidades do país, além disso, apresentam eficiência limitada, de modo que alguns isolados mais virulentos acabam se sobrepondo ao gene de resistência e não dispensam o uso de fungicidas (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015).

Outras doenças que representam ameaça para a produtividade podem ocorrer, mas de maneira geral estão restritas a determinadas regiões devido à sua necessidade de condições específicas para a infecção e sobrevivência. Por exemplo, podridão de sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), importante na região central e sul do Brasil em altitudes acima de 700 m, com temperaturas do ar moderadas, e chuvas frequentes durante a fase de floração; mela de

rhizoctonia (*Rhizoctonia solani* AG1) presente nas regiões do norte do Brasil onde prevalecem condições de chuva quentes; podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*), um problema grave no sudoeste, sul e norte do Brasil onde as tensões ambientais ocorrem durante a estação de crescimento (ALMEIDA et al., 2005).

#### 4.8 OÍDIO (*ERYSIPHE DIFFUSA*)

O oídio causado pelo fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam, ganhou importância no Brasil a partir da safra 1996/97, sendo relatados casos da ocorrência da doença desde a região Sul até as regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil, onde as lavouras mais afetadas apresentaram perdas de rendimento de aproximadamente 25%, alcançando perdas de até 40% (YORINORI, 1997; SILVA; SEGANFREDO, 1999; ALMEIDA et al., 2008; EMBRAPA, 2013), resultando em baixa disponibilidade de sementes de cultivares resistentes, sendo recomendado o uso de tratamento químico como medida emergencial (YORINORI, 1997).

O fungo formando uma fina camada de micélio (XAVIER et al., 2015), e esporos pulverulentos que podem evoluir e cobrir totalmente as partes infectadas. Os sintomas podem se desenvolver em toda parte aérea da planta (IGARASHI et al., 2010). Em casos severos, a ocorrência do fungo reduz a área fotossintética ativa da planta em até 50%, levando ao secamento e queda prematura das folhas (PEREIRA, 2015). A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais visível no início da floração (IGARASHI et al., 2010), e se não controlado o oídio pode causar perdas no rendimento que variam de 10 a 40% (EMBRAPA, 2013; PEREIRA, 2015).

A realização de semeaduras tardias ou safrinha e cultivo no inverno são épocas mais favoráveis à ocorrência do oídio, isso porque o fungo necessita de temperaturas em torno de 18-24°C e baixa umidade relativa do ar para seu desenvolvimento (GRIGOLLI, 2014; PEREIRA, 2015), não se desenvolvendo em temperaturas maiores que 30°C (MIGNUCCI et al., 1977). Além disso, o fungo necessita de uma umidade relativa em torno de 95%, porém não germina na presença de filme d'água na superfície foliar (BEDENDO, 2011)

O oídio é dificilmente controlado por técnicas convencionais visto que o fungo produz esporos que são facilmente dispersos pelo vento. Além do mais o fungo pode ser transmitido por sementes infectadas, resíduos vegetais e algumas ervas daninhas (PÉREZ-VEGA, 2013). O método mais eficiente de controle do oídio consiste no uso de cultivares resistentes, no entanto, mesmo algumas cultivares consideradas resistentes, quando semeadas nas épocas

mais favoráveis a ocorrência do oídio se tornam suscetíveis (GRIGOLLI, 2014), tornando necessária a aplicação de fungicidas.

#### 4.9 FERRUGEM ASIÁTICA (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*)

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem-asiática da soja, ocasiona perdas de produção na cultura da soja em todo o mundo com danos variando de 10% a 90%, sendo considerada uma das doenças mais severas que incide na cultura da soja (GODOY et al., 2016; LANGENBACH et al., 2016). Só no Brasil, já foram perdidos mais de 10 bilhões de dólares com a ferrugem desde o seu surgimento em 2001 (SILVA et al., 2014; LANGENBACH et al., 2016).

Os sintomas iniciais da doença são pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura, lesões esporulentas na superfície abaxial da folha, geralmente associada a clorose foliar, sendo essas lesões compostas por urédias que se rompem e liberam os uredósporos. As lesões aparecem em primeiramente na parte mais baixa do dossel e, em seguida, avança até os terços médio e superior da planta. À medida que a doença progride, as lesões de alta densidade podem se desenvolver, levando a desfolha prematura e maturidade precoce, ocasionando perdas de produtividade (GODOY, 2012; HARTMAN et al., 2015).

O fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório que produz ambas estruturas reprodutivas, os urediniósporos e teliósporos (HARTMAN et al., 2015). Até agora, apenas os esporos são conhecidas por serem importantes em epidemias. A sobrevivência dos fungos durante todo o ano baseia-se na produção contínua de uredósporos num hospedeiro adequado. Além da soja, existem mais de 90 espécies de leguminosas relatadas como *P. pachyrhizi* anfitriões de plantas inoculadas e não-inoculadas (RYTTER et al, 1984; ONO et al, 1992; SLAMINKO et al, 2008; GODOY et al., 2016).

As condições ótimas para o desenvolvimento da cultura coincidem de maneira geral com as condições ótimas para o desenvolvimento da ferrugem. O fungo consegue infectar plantas em temperaturas entre 10 °C e 27.5 °C (com temperatura ótima entre 20 e 23 °C) e um período mínimo de orvalho 6 h (MELCHING et al., 1989; GODOY, 2012). O molhamento foliar contínuo, causado por orvalho ou chuva também favorece o desenvolvimento da doença, sendo a chuva considerada então um fator importante na determinação de níveis epidêmicos no campo (DEL PONTE et al., 2006).

São adotadas diversas medidas de controle da doença, como a implementação do vazio sanitário, que impede o plantio de soja no país por um período de 60 a 90 dias. Além disso, a

severidade da doença e a insensibilidade de fungicidas é monitorada pelo chamado Consócio Antiferrugem, afim de reduzir as perdas (GODOY et al., 2016).

A maioria das cultivares de soja comerciais utilizadas são suscetíveis à ferrugem, e apesar de terem sido lançados cultivares resistentes desde 2009, a eficácia destes genes é limitada pela isolados virulentos que são capazes de superar cada um deles (BONDE et al., 2006; MILES et al, 2006), de forma que mesmo seu uso têm sido recomendado associada ao uso de fungicidas fungicidas (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015). A nova estratégia buscada por melhoristas é a criação de um cultivar com resistência em pirâmide, unindo vários genes de resistência em um só cultivar (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015; LANGENBACH et al., 2016).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; PEREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. Á. M.; BERGAMIN, F. A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 569–88.
- ALMEIDA, A. M. R.; BINNECK, E.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; VALLE, P. R. Z. R. D. O.; SILVEIRA, C. A. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 30, n.1, p. 20-26. 2008.
- ARKOUN, M.; JANNIN, L.; LAÎNÉ, P.; ETIENNE, P.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CITERNE, S.; GARNICA, M.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; OURRY, A. A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, Netherlands, v. 362, n.1, p. 79-92, 2013.
- BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant physiology**, New York, v. 140, n. 2, p. 433-443, 2006.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders-strategies in response of plants to heavy metals, **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 3, n. 1-4, p. 634-654. 1981.
- BARBOSA, G. F.; CENTURION, M. A. P. C.; FERRAUDO, A. S. Potencial do manejo integrado da ferrugem asiática da soja: severidade da doença, desenvolvimento vegetativo e componentes da produção, cultivar MG/BR-46 (Conquista). **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 30, n. 1, p. 76-89, 2014.
- BARSUKOVA, V. S.; GAMZIKOVA, O. I., Effects of nickel surplus on the element content in wheat varieties contrasting in Ni resistance. **Agrokhimiya**, Moskow, v. 1, n. 1999, p. 80–85, 1999.
- BEDENDO, I. P. Oídios. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. Á. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 289
- BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. () Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 708–716. 2006
- BOYD, R.; MARTENS, S. Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): a constitutive trait. **American journal of botany**, St. Louis, v. 85, n. 2, p. 259-259, 1998.
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p. 801-803, 1987.

BROWN, P. H. Nickel. In: BARKER, A. V. E.; PILBEAM, D. J. (Ed.). **Handbook of plant nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.395-409.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureasas as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, Amsterdam, v. 110, p. 90-109, 2016.

CATALDO, D. A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. **Plant Physiology**. New York, v. 62, n. 4, p. 5636–5665, 1978.

CATALDO, D. A.; McFADDEN, K. M.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Organic constituents and complexation of Nickel (II), Iron (III), Cadmium (II) and Plutonium (IV) in Soybean Xylem Exudates. **Plant Physiology**, New York, v. 86, n. 3, p. 734–739. 1988.

CHEN, C.; HUANG, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. **Clean–soil, air, water**, Malden, v. 37, n. 4-5, p. 304-313, 2009.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate - a literatura analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 48-74.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2015/16**, n. 9 - nono levantamento, junho 2016. Brasília: Conab, 2016. v. 2, n. 9, p. 1-174. Disponível em: <  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_06\\_09\\_16\\_49\\_15\\_boletim\\_graos\\_junho\\_\\_2016\\_-\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf)>. Acesso em: 30 jun 2016

CORNU, J. Y.; DEINLEIN, U.; HÖRETH, S.; BRAUN, M.; SCHMIDT, H.; WEBER, M.; PERSON, D. P.; HUSTED, S.; SCHJOERRING, J. K.; CLEMENS, S. Contrasting effects of nicotianamine synthase knockdown on zinc and nickel tolerance and accumulation in the zinc/cadmium hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 206, n. 2, p. 738-750, 2015.

DAS, P. K.; KAR, M.; MISHRA, D. Nickel nutrition of plants: effect of nickel on some oxidase activities during rice (*Oryza sativa* L.) seed germination, **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 225–233, 1978.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. III Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 91- 132.

DEL PONTE, E. M.; GODOY, C. V.; LI, X.; YANG, X. B. Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 7, p.797-803, 2006. DOI: 10.1094/ PHYTO-96-0797.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme: simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, Columbus, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, 1975.

EHLKEN, S.; KIRCHNER, G. Environmental processes affecting plant root uptake of radioactive trace elements and variability of transfer factor data: a review. **Journal of Environmental Radioactivity**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 97-112, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Sistemas de produção 16**: tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja**: Região Central do Brasil. Londrina: Embrapa soja, 2004. 15 p. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca>>. Acesso em: 7 abr 2014.

EMSLEY, J. **The elements**. Oxford: Clarendon, 1991. 300 p.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher-plants. **Science**, Washington, v. 222, n. 4624, p. 621-623, 1983.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. **Plant Physiology**, New York, v. 3, n. 76, p. 691-693, 1984.

EVANS, H. J.; HARKER, A. R.; PAPEN, H.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 335-361, 1987.

FABIANO, C. C.; TEZOTTO, T.; FAVARIN J. L.; POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P. Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 6, n. 754, p. 1-4, 2015.

FRANCO, G. C. **Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da fixação biológica e atividade da urease**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2015.

FREEMAN, J. L.; PERSANS, M. W.; NIEMAN, K.; ALBRECHT, C.; PEER, W.; PICKERING, I. J.; SALT, D. E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 16, n. 8, p. 2176-2191, 2004.

GABBRIELLI, R., PANDOLFINI, T. Effect of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species, **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 62, n. 4, p. 540-544. 1984.

GERENDAS, J.; SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> or urea as N source. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 65-71, 1999.

GERENDÁS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K.; SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Landau, v. 162, n. 3, p. 241-256, 1999.

GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In: TARLOCHAN, S. T. **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Wallingford: CABI, 2012. p. 97-95.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; ROESE, A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. N. P. de; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2012/13**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. : Londrina: Embrapa Soja 2013. 7 p. (Circular técnica, 99).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. N. P. de; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2013/14**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja: 2014. 7 p. (Circular técnica, 103).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; MADALOSSO, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas multissítios e fertilizantes no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015a. 7p. (Circular técnica, 113).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina; Embrapa Soja, 2015b. 6 p. (Circular técnica, 111).

GODOY, C. V.; BUENO, A. F.; GAZZIERO, D. L. P. Brazilian Soybean Pest Management and Threats to its Sustainability. **Outlooks on Pest Management**, Buckinghamshire, v. 26, n. 3, p. 113-117, 2015.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and

future. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500002

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 5, p. 420-429, 2006.

GONZÁLEZ, C. I.; MAINE, M. A.; CAZENAVE, J.; HADAD, H. R.; BENAVIDES, M. P. Ni accumulation and its effects on physiological and biochemical parameters of *Eichhornia crassipes*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 20-27, 2015.

GRAHAM, R. D.; WELCH, R. M.; WALKER, C. D. A role for nickel in the resistance of plants to rust. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE, 3., 1985, Hobart. **Proceedings...** Hobart: Australian Society of Agronomy, 1985. 337 p.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. DE C.; ROSCOE, R. (Ed.). **Tecnologia e produção: soja 2013/2014**. Maracaju: Fundação MS, 2014. p. 205-231.

GUERINOT, M. L., **Molecular Mechanisms of Ion Transport in plant cells, Phytoremediation of Toxic Metals: using plants to clean up the environment** New York: John Wiley and Sons, 2000. p. 271–285.

HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2015. p. 56-58.

HOMER, F. A.; REEVES, R. D.; BROOKS, R. R.; BAKER, A. J. M. Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *dichapetalum gelonioides*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 2141–2145. 1991.

IGARASHI, S.; OLIVEIRA, G. M.; CAMARGO, L. C. M.; FALKOSKI FILHO, J.; GARDIANO, C. G.; BALAN, M. G. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 245-250, 2010.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 4. ed. Boca Raton: CRC, 2011. v. 4, 520 p.

KHALID, B. Y.; TINSLEY, J., Some effects of nickel toxicity on rye grass, **Plant and Soil**, Netherlands, v. 55, n. 1, p. 139–144. 1980.

KERSTEN, W. J.; BROOKS, R.R.; REEVES, R.D.; JAFFRE, T. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants, **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 19, n. 9, p. 1963–1965. 1980.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; RAO, J. N. Control of foliar diseases of groundnut using inorganic and metal salts. **International Arachis Newsletter**, Patancheru, v. 21, n. 1, p. 33-35, 2001.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A., EVANS, H. J. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 8, n. 80, p. 2253-2257, 1983.

KORNER, L. E.; MOLLER, L.; JENSÉN, M., P. Effects of Ca<sup>2+</sup> and other divalent cations on uptake of Ni<sup>2+</sup> by excised barley roots, **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 71, n. 1, p. 49–54. 1987.

KOZLOV, M. V.; HAUKIOJA, E.; BAKHTIAROV, A. V.; STROGANOV, D. N.; ZIMINA, S. N. Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behaviour of nickel and copper. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 413-420, 2000.

KRAMER, U.; COTTER-HOWELLS, J. D.; CHARNOCK, J. M.; BAKER, A. J. M.; SMITH, A. C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, London, v. 379, n. 6566, p. 635–638. 1996.

KRAMER, U.; SMITH, R. D.; WENZEL, W. W.; RASKIN, I.; SALT, D. E. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by thlaspi goesingense halacsy, **Plant Physiology**, New York, v. 115, n. 4, p. 1641–1650. 1997.

KRÄMER, U; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Raskin, I.; Salt, D. E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator Thlaspi species. **Plant Physiology**, New York, v. 122, n. 4, p. 1343-1354, 2000.

KÜPPER, H.; KRONECK, P. M. H. Nickel in the Environment and Its Role in the Metabolism of Plants and Cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL H.; SIGEL R. K. O. (Ed.). **Nickel and its surprising impact in nature**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2007. v. 2, 2006. p. 31.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, London, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016. DOI: 10.1039/C5MT00244C.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; ÇAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 1007, n. 1-2, p.115, 2012.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; ÇAKMAK, I. Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate fed soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 376, n. 1-2, p. 261-276, 2013a.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; ÇAKMAK, I. Foliar nickel application alleviates detrimental effects of glyphosate drift on yield and seed quality of wheat. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 61, n. 35, p. 8364-8372, 2013b.

- LANGENBACH, C.; CAMPE, R.; BEYER, S. F.; MÜLLER, A. N.; CONRATH, U Fighting Asian soybean rust. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 797, 2016.
- LAVRES, J.; FRANCO, G. C.; DE SOUSA CÂMARA, G. M. Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 4, n. 1, p. 37, 2016.
- LEE, J.; REEVES, R. D.; BROOKS, R. R.; JAFFRE, T. Isolation and identification of a citrate-complex of nickel from nickel-accumulating plants, **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 1503–1505. 1977.
- LI, L., TUTONE, A. F., DRUMMOND, R. S. M., GARDNER, R. C., LUAN, S. A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 13, n. 12, p. 2761–2775. 2001.
- LI, L. G.; SOKOLOV, L. N.; YANG, Y. H.; LI, D. P.; TING, J.; PANDY, G. K.; LUAN, S. A mitochondrial magnesium transporter functions in arabidopsis pollen development. **Molecular Plant**, Netherland, v. 1, n. 4, p. 675–685. 2008.
- LI, Y.; ZAMBLE, D. B. Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. **Chemical reviews**, Washington, v. 109, n. 10, p. 4617-4643, 2009.
- LIU, G. E.; SIMONNE, H.; LI, Y. **Nickel nutrition in plants**. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, 2011. 5 p.
- LÓPEZ, M.; CARBONERO, V.; CABRERA, E., RUIZ-ARGÜESO, T. Effects of host on the expression of the H<sub>2</sub>-uptake hydrogenase of *Rhizobium* in legume nodules. **Plant Science Letters**, Netherland, v. 29, n. 2-3, p.191-199, 1983.
- MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Ed.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: Internacional Plant Nutrition Institute, 2007. 722 p.
- MELCHING, J. S.; DOWLER, W. M.; KOOGLE, D. L.; ROYER, M. H. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, Saint Paul, v.73, n. 2, p.117-122, 1989. DOI: 10.1094/PD-73-0117
- MIGNUCCI, J. S.; LIM, S. M.; HEPPELRY, P. R. Effects of temperature on reactions of soybean seedlings to powdery mildew [*Microsphaera diffusa*, fungal diseases]. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 61, n. 1, p. 122-124, 1977.
- MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress**, St Paul, 2006. doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>>. Acesso em: 30 jun 2016.
- MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolism. **The Botanical Review**, New York, v. 40, n. 4, p. 395-452, 1974.

NISHIDA, S.; AISU, A.; MIZUNO, T. Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in *Arabidopsis*. **Plant signaling & behavior**, Behav, v. 7, n. 3, p. 329–331. 2012.

NISHIDA, S.; KATO, A.; TSUZUKI, C.; YOSHIDA, J.; MIZUNO, T. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 5, p. 9420-9430, 2015.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant, cell & environment**, Malden, v. 35, n. 2, p. 454-484, 2012.

ONO, Y.; BURITICÁ, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 10, p. 825-850, 1992.

PANDEY, N.; SHARMA, C. P. Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, Netherland, v. 163, n. 4, p. 753-758, 2002.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 15, n. 6, p. 719-725, 1992.

PEREIRA, A. A. **Caracterização molecular do loco Red associado a resistência ao oídio da soja**. 2015. 71 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

PÉREZ-VEGA, E.; TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Genetic mapping of two genes conferring resistance to powdery mildew in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 6, n. 6, p. 1503-1512. 2013.

PERSANS, M. W.; YAN, X.; PATNOE, J. M.; KRAMER, U.; SALT, D. E. Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesin-* gense (Halacsy). **Plant Physiology**, New York, v. 121, n. 4, p. 1117–1126. 1999.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **International review of cytology**, Netherland, v. 145, n. 1, p. 56-103, 1993.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion–nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant science**, Netherland, v. 199, n. 1, p. 79-90, 2013.

QUEIROZ, C. S. **Níquel, outros micronutrientes e silício e a ferrugem asiática (*Phakopsora Pachyrhizi*) na cultura da soja (*Glycine Max*)**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

RAO, K. V. M.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant science**, Nethreland,v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.

REILLEY, C.; CRAWFORD, M.; BUCK, J. Nickel suppresses daylily rust, *Puccinia*

- hemerocallidis* on susceptible daylilys, *Hemerocallis* in greenhouse and field trials. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. S88-S88, 2005.
- REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agrônômicas**, Piracicaba, v. 1, n. 147, p. 10-24. 2014.
- RUTER, J. M. Effect of nickel applications for the control of mouse ear disorder on river birch. **Journal of Environmental Horticulture**, Columbus, v. 23, n. 1, p. 17-20. 2005.
- RYTTER, J. L.; DOWLER, W. M.; BROMFIELD, K. R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 9, p. 818-819, 1984. DOI: 10.1094/ PD-68-818.
- SAGNER, S.; KNEER, R.; WANNER, G.; COSSON, J.-P.; DEUS- NEUMANN, B.; ZENK, M. H. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*, **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 339–343, 1998.
- SCALABRIN, E.; RADAELLI, M.; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 103, n. 1, p. 53-60, 2016.
- SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia plantarum**, Malden, v. 105, n. 1, p. 39-44, 1999.
- SELLSTEDT, A.; SMITH, G. D. Nickel is essential for active hydrogenase in free-living frankia isolated from casuarina. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Delft, v. 70, n. 2, p. 137-140, 1990.
- SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B., Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 4, p. 523–544. 2001.
- SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.
- SILVA, O. C.; SEGANFREDO, R. Quantificação de danos ocasionados por doenças de final de ciclo e oídio, em duas variedades de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 460.
- SILVA, A. C. D.; SOUZA, P. E. D.; AMARAL, D. C.; ZEVIANI, W. M.; PINTO, J. E. B. P. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of asian soybean rust. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringa, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2014.
- SIRHINDI, G.; MIR, M. A.; SHARMA, P.; GILL, S. S.; KAUR, H.; MUSHTAQ, R. Modulatory role of jasmonic acid on photosynthetic pigments, antioxidants and stress markers

of *Glycine max* L. under nickel stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 21, n. 4, p. 559-565, 2015.

SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 767-771, 2008.

TAN, X.W.; IKEDA, H.; ODA, M. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 84, n. 3, p. 265-273, 2000.

TEMP, G. A. Nickel in plants and its toxicity. In: ALEKSEEVA-POPOVA, N. V. (Ed). **Resistance of wild species to heavy metals**. Lenuprizdat: Leningrad, 1991. p. 139-146

TEZOTTO, T. **Metabolismo do nitrogênio e senescência em razão da aplicação de níquel no cafeeiro arábica**. 2015. 147 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2015.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN biochemistry**, Cairo, v. 2013 n.1, p. 1-10., 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. **Oilseeds: world markets and trade**. Washington: USDA Forest Service, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 10 abr 2016

URETA, A.C.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J.M. Rhizobium leguminosarum biovar viciae symbiotic hydrogenase activity and processing are limited by the level of nickel in agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n. 71, p. 7603-7606, 2005.

WALKER, C. D.; GRAHAM, R. D.; MADISON, J. T.; CARY, E. E.; WELCH, R. M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, New York, v. 79, n. 2, p. 474-479, 1985.

WELCH, R. M. The biological significance of nickel. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 345-356, 1981.

WHITE, P. J. Long-distance transport in the xylem and phloem. In: MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3rd ed. London: Academic Press, 2012. 49-70 p.

WIEBKE-STROHM, B.; PASQUALI, G.; MARGIS-PINHEIRO, M.; BENCKE, M. ; BÜCKER-NETO, L. B.; BECKER-RITT, A.; MARTINELLI, A. H. S.; RECHENMACHER, C.; POLACCO, J. C.; STOLF, R.; MARCELINO, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; HOMRICH, M. S.; DEL PONTE, E. M.; CARLINI, C. R.; CARVALHO, M. C. C. G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. **Plant molecular biology**, Netherland, v. 79, n. 1-2, p. 75-87, 2012.

- WIEBKE-STROHM, B.; LIGABUE-BRAUN, R.; RECHENMACHER, C.; OLIVEIRA-BUSATTO, L.A.; CARLINI, C.R.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 101, n. 1, p. 96-104, 2016.
- WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, Netherland, v. 180, n. 3, p. 431–438, 2011.
- WOOD, B. W.; REILLY, C. C.; NYCZEPIR, A. P. Field deficiency of nickel in trees: symptoms and causes. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 721, n. 1, p. 83-97, 2006.
- WOOD, B. W.; REILLY, C. C. Nickel and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 2007. p. 215-231.
- WOOD, B.; REILLY, C.; BOCK, C.; HOTCHKISS, M. Suppression of Pecan Scab by Nickel. **HortScience**, Netherland, v. 47, n. 4, p. 503-508, 2011.
- XAVIER, S. A.; MELLO, F. E. D.; CANTERI, M. G.; GODOY, C. V. Photosynthesis of soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola* and *Erysiphe diffusa*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 2, p. 156-159, 2015.
- YORINORI, J. T. **Oídio da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1997. 5 p. (Comunicado Técnico, 59).
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005
- YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Netherland, v. 86, n. 1, p. 1-17, 2011.
- ZELLER, S.; FELLER, U., Redistribution of cobalt and nickel in detached wheat shoots: effects of steam: girdling and of cobalt and nickel supply. **Biologia Plantarum**, Netherland, v. 41, n. 3, p. 427–434. 1998.
- ZOBIOLE, L. H. S.; DE OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; HUBER, D. M.; CONSTANTIN, J.; DE CASTRO, C.; DE OLIVEIRA, F. A.; DE OLIVEIRA JUNIOR, A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 328, n. 1-2, p. 57-69, 2010.
- ZONIA, L. E.; STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Physiology**, New York, v. 107, n. 4, p. 1097–1103, 1995.

## CAPÍTULO II

### Níquel foliar na nutrição, atividade da urease e qualidade fisiológica de sementes de soja

#### RESUMO

O níquel (Ni) em baixas concentrações é um elemento essencial para as plantas, é co-fator da enzima urease e atua na germinação de sementes. Esse trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação foliar de doses de Ni na nutrição mineral, atividade da urease e na qualidade fisiológica das sementes de soja. O estudo foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 7 x 2, sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associadas ou não a dose de 75 g i.a. ha<sup>-1</sup> do fungicida contendo a molécula piraclostrobina. O teor foliar de nitrogênio apresentou aumento linear em resposta a aplicação doses de Ni combinadas ou não ao fungicida. Já o teor foliar de enxofre reduziu linearmente com o aumento das doses de Ni e aumentou quando o Ni foi associado com a piraclostrobina. Em relação ao teor foliar dos demais macronutrientes (P, K, Ca, Mg) não houve efeito significativo do Ni associado ou não ao fungicida. O teor de Ni nas folhas e nos grãos aumentou linearmente em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida. Houve correlação altamente significativa entre teor de Ni nas folhas e grãos ( $r = 0,99$ ), indicando alta translocação do nutriente das folhas para os grãos. A atividade da urease aumentou até a dose 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni, com o a maior atividade entre as doses 20 e 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, independente da aplicação ou não do fungicida, seguido de queda com o aumento das doses de Ni. A atividade da urease apresentou alta correlação com a produtividade de sementes ( $r = 0,88$ ) e número de vagens ( $r = 0,84$ ). Em relação a qualidade fisiológica de sementes, a porcentagem de germinação e a taxa de emergência aumentaram linearmente com o aumento das doses de Ni sem fungicida. Porém, quando o Ni foi associado a piraclostrobina a porcentagem de germinação apresentou ajuste quadrático, com aumento da germinação até a dose de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni. A condutividade elétrica aumentou até a as doses 40 e 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni, com curva semelhante para os tratamentos com e sem fungicida. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento de plântula e massa seca de plântulas. A aplicação foliar de Ni até a dose de 20 g ha<sup>-1</sup> associado ou não a piraclostrobina foi benéfica baseado nos parâmetros produtivos, nutricionais e qualidade fisiológica de sementes de soja.

**Palavras-chave:** Piraclostrobina. Micronutriente. Atividade enzimática.

## **Effect of foliar nickel application on plant mineral nutrition, urease activity and physiological quality of soybean seeds**

### **ABSTRACT**

Nickel (Ni) is an essential element for higher plants at low concentration and plays a variety of roles on plant metabolism such as urease cofactor and seed germination. This study aimed to evaluate the effect of foliar Ni application on plant nutritional status, urease activity and the physiological quality of soybean seeds. The study was conducted in randomized plots in a factorial scheme 7 x 2, where; 7 levels of Ni concentration (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 g ha<sup>-1</sup>) combined or not with 75 g ha<sup>-1</sup> e.a. fungicide containing pyraclostrobin molecule. The leaf nitrogen concentration increased linearly in response to Ni application combined or not with fungicide. The leaf sulfur concentration decreased linearly in response to Ni application and increased when Ni was associated with pyraclostrobin. Regarding the leaf concentration of other macronutrients (P, K, Ca, Mg) there was no significant effect of Ni application combined or not with fungicide. The Ni concentration in leaves and grains increased linearly. There was highly significant correlation between Ni concentration in the leaves and grains ( $r = 0.99$ ), indicating high translocation of Ni from leaves to grains. The urease activity increased up to 20 g ha<sup>-1</sup> of Ni, showing the highest activity between 20 and 40 g ha<sup>-1</sup> of Ni supply. The urease activity showed high correlation to seed yield ( $r = 0.88$ ) and number of pods ( $r = 0.84$ ). Regarding the physiological quality of seeds, germination and emergence rate increased linearly in response to foliar Ni application. However, germination of soybean seeds increased up to 40 g ha<sup>-1</sup> when Ni was combined with Pyraclostrobin. The electrical conductivity increased up to 40 and 60 g ha<sup>-1</sup> of Ni supply. There was no Ni application effect on seedling length and seedling dry weight. The foliar Ni application up to 20 g ha<sup>-1</sup> combined or not with pyraclostrobin showed benefits on mineral plant nutrition, urease and soybean seeds yield.

**Key-words:** Pyraclostrobin. Micronutrient. Enzymatic activity.

### 3 INTRODUÇÃO

Uma das etapas mais importantes na produção de soja é a obtenção de sementes de alta qualidade, porém, diversos fatores afetam a qualidade das sementes, destacando-se a adubação (SÁ, 1994; KAPPES; GOLO; DE CARVALHO, 2008). A ocorrência de deficiência de micronutrientes além de limitar a produtividade, pode influenciar a qualidade das sementes, e interfere nos aspectos fitossanitários (KAPPES; GOLO; DE CARVALHO, 2008).

O níquel (Ni) era classificado como não essencial ou tóxico para as plantas (MALAVOLTA; MORAES, 2007). Entretanto, sua essencialidade foi comprovada ao demonstrar que ele satisfaz os critérios diretos, por ser componente da enzima urease (EC 3.5.1.5., ureia amidohidrolase) (DIXON et al. 1975), e indiretos ao demonstrar que soja (ESKEW; WELCH; CARY, 1983), feijão (*Vigna unguiculata*) (ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984) e cevada (BROWN; WELCH; CARY, 1987), não completam seu ciclo de vida na ausência do metal, fatores que fizeram que o Ni fosse adicionado a lista de micronutrientes.

A ureia é produzida na planta como produto do catabolismo da arginina, que é particularmente importante no processo de remobilização do nitrogênio durante a germinação de sementes e durante o processo de senescência, e está presente em todas as plantas superiores (WALKER et al., 1985; WITTE, 2011; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013<sup>a</sup>). Plantas de soja ainda possuem duas vias adicionais de biossíntese da ureia: através do catabolismo de purina, conduzindo à formação de ureídeos, que compõem a principal forma de reserva para translocação de nitrogênio a partir de raízes em rebentos (via característica de leguminosas); e finalmente, um percurso adicional a partir de um aminoácido não proteico, a canavanina, encontrada apenas em feijão de porco e soja, e que exerce influência sobre síntese de glutamina (WALKER et al., 1985; ZONIA; STEBBINS; POLACCO, 1995).

Na planta, a ureia somente é reciclada pela ação da urease (POLACCO; HOLLAND, 1993), enzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (DIXON et al., 1975). A urease possui dois íons de Ni em seu centro ativo (CIURLI, 2001).

Plantas cultivadas com privação de Ni produzem sementes com baixo índice de germinação, e plântulas com crescimento reduzido. Esse quadro é revertido com a adição de Ni a solução de crescimento dessas sementes (ESKEW; WELCH; CARY, 1983; BROWN; WELCH; CARY, et al., 1987). Outros experimentos entretanto, demonstraram que o conteúdo de Ni na semente tem maior influência sobre a germinação e vigor de plântulas, sendo que a aplicação de Ni não substitui o conteúdo de reserva da semente, conteúdo este que é capaz inclusive de evitar sintomas de toxidez pela aplicação foliar de ureia, e sintomas

de deriva de glifosato (ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013b). Além disso, inibidores de urease também impedem a germinação de sementes, que é retomada com a adição de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e aminoácidos (ZONIA; STEBBINS; POLACCO, 1995). Nesse sentido aplicações de Ni foliar em plantas de soja poderia incrementar os teores desse micronutriente nas sementes de soja, promovendo a atividade da urease e contribuindo para produção de sementes de soja de melhor qualidade (LAVRES; FRANCO; CÂMARA, 2016).

Assim, concentrações suficientemente altas de micronutrientes nas sementes podem melhorar o crescimento e a produtividade das culturas, particularmente em solos pobres em nutrientes (CAKMAK, 2008; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013<sup>a</sup>). Além de ser atribuído ao Ni efeito sobre o controle de doenças fúngicas (MORAES; ABREU JUNIOR; LAVRES JUNIOR, 2010; REIS et al., 2014).

Outro ponto importante da produção de sementes se refere a sanidade da planta e do material produzido. Nesse sentido, é comum a adoção de fungicidas foliares para controle de doenças em soja.

Sabe-se que alguns grupos químicos de fungicidas possuem efeito fisiológico sobre as plantas, promovendo incremento na taxa fotossintética e na atividade da enzima nitrato redutase foliar, além de decréscimo da taxa respiratória, como é o caso da molécula piraclostrobina (FAGAN, 2010; CARRIJO, 2014). Portanto, tanto a adubação foliar com Ni como a aplicação de piraclostrobina, na fase vegetativa, poderiam contribuir com a produção de sementes de soja. Porém estudos sobre a interação desse fungicida e adubação foliar com Ni são inexistentes. Dessa forma, objetivou-se estudar o efeito da adubação foliar de Ni associado ou não a fungicida sobre a produtividade da soja e sobre a qualidade das sementes obtidas.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL**

O presente estudo foi conduzido durante 01 de novembro de 2014 a 27 de fevereiro de 2015 na Fazenda Campo Bom, localizada no município de Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil (18°46'24.38"S e Long. 52°37'23.75"O, localizada a uma altitude média de 820 m). O clima da região é classificado como tropical úmido, com inverno seco e verão chuvoso, temperatura média variando entre 13 e 28 °C e precipitação pluviométrica anual média de 1.850 mm (CUNHA; MAGALHÃES; CASTRO, 2013).

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico (LVd) muito argiloso, e corresponde a ordem Oxisol (SOIL SURVEY STAFF, 1999). O solo apresentava as seguintes características químicas: pH cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 4,7; cálcio  $2,6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; magnésio  $0,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; alumínio  $0,18 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^+ + \text{Al}$   $6,7 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; potássio  $58 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; fósforo (Melich)  $6 \text{ mg dm}^{-3}$ ; enxofre  $4,8 \text{ mg dm}^{-3}$ ; boro  $0,36 \text{ mg dm}^{-3}$ ; cobre  $0,9 \text{ mg dm}^{-3}$ ; ferro  $49 \text{ mg dm}^{-3}$ ; manganês  $9,5 \text{ mg dm}^{-3}$ ; zinco  $2,7 \text{ mg dm}^{-3}$ ; matéria orgânica  $25 \text{ g dm}^{-3}$ ; níquel  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ ; capacidade de troca catiônica  $9,9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ . As propriedades físicas do solo são: argila  $610 \text{ g dm}^{-3}$ ; silte  $50 \text{ g dm}^{-3}$ ; e areia  $340 \text{ g dm}^{-3}$ .

#### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O estudo foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial  $7 \times 2$ , sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e  $100 \text{ g ha}^{-1}$ ) utilizando como fonte sulfato de níquel, associadas ou não a dose de  $75 \text{ g i.a. ha}^{-1}$  do fungicida Piraclostrobina (Marca comercial Comet), aplicados durante estágio fenológico R1 com quatro repetições.

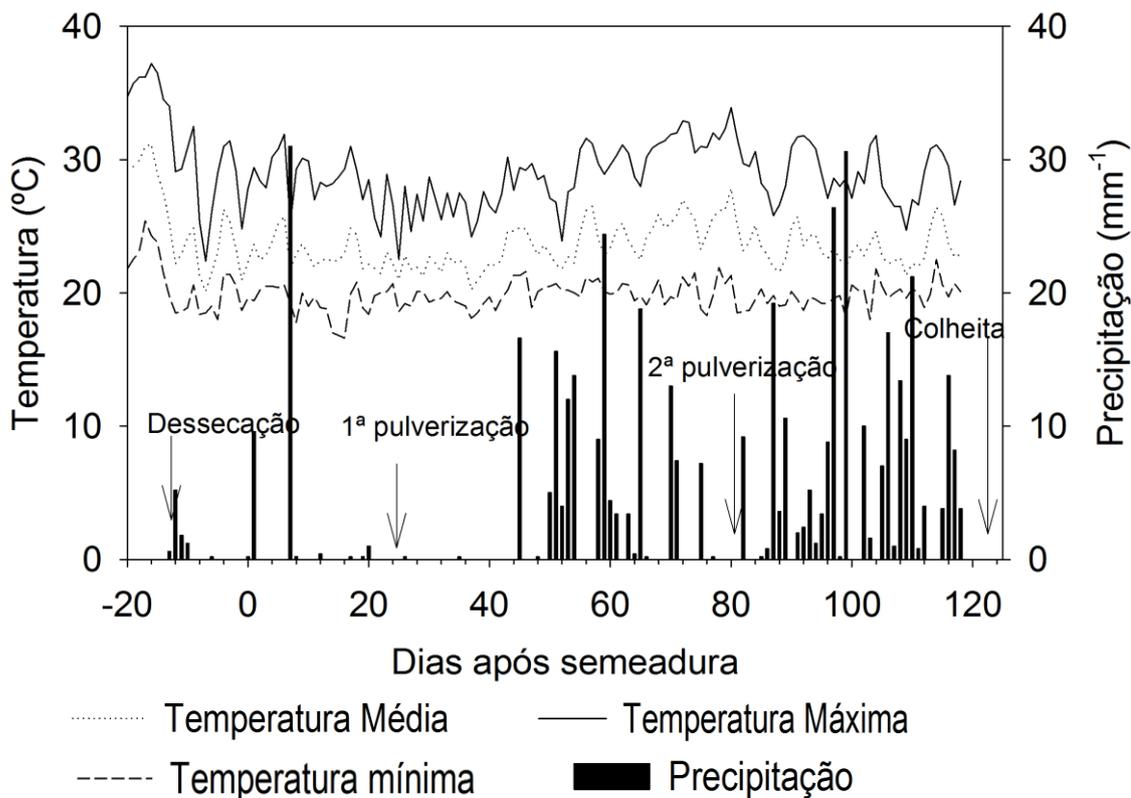
#### 4.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido em sistema de semeadura direta, sobre os restos culturais de nabo forrageiro. A dessecação da área foi realizada 15 dias antes da semeadura, utilizando-se glifosato  $1440 \text{ g i.a. ha}^{-1}$  + carfentrazone-ethyl  $30 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ .

A cultivar de soja adotada foi a Anta 82 RR a qual apresenta na localidade ciclo aproximado de 115 dias. As sementes foram previamente tratadas com Fipronil + Tiofanato metílico e piraclostrobina nas seguintes concentrações ( $5 \text{ g i.a.} + 45 \text{ g i.a.} + 50 \text{ g i.a.}$  para cada  $100 \text{ kg}$  de semente, respectivamente). A adubação de semeadura foi baseada em  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de MAP 10-50-00. A inoculação foi realizada por meio de pulverização direta no sulco de semeadura, utilizando-se  $600 \text{ mL ha}^{-1}$  de inoculante líquido contendo *Bradyrhizobium japonicum*.

A semeadura foi realizada visando um stand de  $340.000 \text{ plantas ha}^{-1}$ . As parcelas experimentais consistiram de seis linhas de  $6 \text{ m}$  espaçadas com  $0,45 \text{ m}$ , se considerando como área útil as duas linhas centrais, excluindo-se  $0,5 \text{ m}$  das extremidades. Os dados de pluviosidade temperaturas médias durante o ciclo da cultura estão indicados na Figura 1.

**Figura 1-** Dados climáticos indicando a temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura média e precipitação durante a execução do experimento no município de Chapadão do Sul-MS, Brasil.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Durante o ciclo de desenvolvimento das plantas o manejo fitossanitário foi realizado por meio de duas pulverizações sendo a primeira aos 25 dias após a semeadura utilizando-se: glifosato 1,440 g i.a. ha<sup>-1</sup> + clorantraniliprole 10 g i.a. ha<sup>-1</sup> + teflubenzuron 15 g i.a. ha<sup>-1</sup>. A segunda aplicação foi realizada aos 75 dias após a semeadura utilizando-se clorantraniliprole 10 g i.a. ha<sup>-1</sup> + teflubenzuron 15 g i.a. ha<sup>-1</sup> + acefato 800 g i.a. ha<sup>-1</sup>.

#### 4.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

##### 4.4.1 Análise nutricional

Para as análises nutricionais, coletou-se o terceiro trifólio a partir do ápice de 20 plantas por parcela aos doze dias após a aplicação dos tratamentos. As plantas estavam no estágio R2 de desenvolvimento fenológico da soja. O material, após seco, foi utilizado para quantificar os teores foliares dos macro e micronutrientes. Os grãos coletados durante o estágio fenológico R8 também foram analisados.

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl, após digestão sulfúrica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Para quantificação dos demais nutrientes efetuou-se digestão nitroperclórica (JOHNSON; ULRICH, 1959) e incineração no caso do boro (ALCARDE, 1969). A determinação foi realizada em espectrofotometria de absorção atômica, com exceção do fósforo e enxofre determinado em espectrofotometria.

#### **4.4.2 Índice de clorofila**

No estágio fenológico R2, foram realizadas medições indiretas de clorofila com um medidor eletrônico portátil de intensidade da cor verde das plantas (SPAD), modelo Digital SPAD 502 (MINOLTA). A leitura foi efetuada em três plantas por parcela, em cinco pontos da terceira folha da haste principal do terço superior.

#### **4.4.3 Atividade da urease (EC 3.5.1.5)**

Foi coletado o terceiro trifólio a partir do ápice, a fim de gerar a quantificação da atividade das enzimas urease (EC 3.5.1.5.), dez dias após a aplicação dos tratamentos, no estágio fenológico R2. As amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório para extração e análise da atividade enzimática.

A atividade da urease foi determinada em função da produção de N-NH<sub>4</sub>, segundo metodologia de McCullough (1967) e o extrato foi obtido segundo metodologia descrita por Hogan, Swift e Done (1983). Após a coleta, 0,2 g da massa fresca foliar foi inserida em 8 mL de tampão fosfato de sódio com ureia pH 7.4 e foram mantidos em banho-maria a 30 °C com agitação durante 3 horas para extração. A uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionado 2,5 mL do reagente I: fenol (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e nitroprussiato de sódio (SNP) (170 µmol L<sup>-1</sup>), seguido de agitação, e em seguida 2,5 mL do reagente II: hidróxido de sódio (0,125 mol L<sup>-1</sup>), fosfato dissódico (0,15 mol L<sup>-1</sup>) e hipoclorito de sódio (3% Cl<sub>2</sub>). Efetuou-se nova incubação em banho-maria a 37 °C por 35 minutos. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em µmol N-NH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup>.

#### **4.4.4 Avaliações de crescimento e produtividade**

No estágio fenológico R8 da soja foram avaliados o número de vagens das plantas, e grãos por vagem. A avaliação foi realizada em cinco plantas da área útil de cada parcela. Nesse mesmo estágio foi efetuada a determinação da massa de 100 grãos e avaliação da produtividade, com umidade padronizada a 13%, colhendo-se as plantas da área útil.

#### 4.4.5 Qualidade fisiológica de sementes

Para a realização dos teste de germinação, as repetições de cada tratamento foram agrupadas, gerando uma única parcela por tratamentos, realizando-se os testes de vigor logo após.

**Teste de germinação:** O teste de germinação foi realizado utilizando-se 4 repetições de 50 sementes, as sementes foram, armazenadas em rolos de papel, previamente umedecidos a 2,5 vezes a sua própria massa, então foram mantidos em incubadoras a 25 °C. Realizou-se duas contagens, aos 5 e 8 dias após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Comprimento da plântula:** Realizada após a última contagem de germinação, aferindo-se o comprimento das plântulas da parcela.

**Massa seca das plântulas:** Ocorreu após a secagem das parcelas, determinando-se a massa total da parcela.

**Emergência:** A semeadura foi realizada em bandeja de poliestireno, utilizando-se como substrato casca de pinus. As bandejas foram acondicionadas em casa de vegetação. A emergência foi contabilizada, aos 8 dias após a semeadura considerando-se as plântulas normais.

**Condutividade elétrica:** Foram utilizadas 50 sementes por parcela. As sementes foram colocadas em copos descartáveis com 75 mL de água deionizada. As sementes foram mantidas em repouso a temperatura de 25 °C, após 24 horas determinando-se a condutividade elétrica das amostras (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999)

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os conjuntos de dados considerados, foi analisada a normalidade dos dados, utilizando-se o teste de Anderson-Darling e verificando-se a homocedasticidade dos dados com o teste da equação da variância (ou teste de Levenn's). Os dados foram submetidos à análise de variância, com níveis de significância de 0,05 de probabilidade, pelo teste F. Quando significativas, foi realizada análise de regressão probabilidade utilizando-se o programa estatístico Minitab e Sigmaplot.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação foliar de Ni alterou o conteúdo foliar de nitrogênio nas plantas de soja, que apresentou aumento linear com o aumento das doses de Ni, tanto para os tratamentos sem fungicida como para os tratamentos com fungicida (Figura 2-A). Resultados semelhantes

foram obtidos para a aplicação isolada de Ni em plantas de tomate (TAN; IKEDA; ODA, 2000) e soja (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012).

Foi observado ainda efeito sinérgico da aplicação de fungicida a base de piraclostrobina sobre as doses de Ni no conteúdo foliar de nitrogênio (Figura 2-A). Aumentos no teor foliar de nitrogênio de bananeiras tratadas com piraclostrobina também foram observados por Lima et al. (2012). O efeito atribuído a ação dessa molécula no aumento da atividade da enzima nitrato redutase, que melhora a assimilação de nitrogênio nas plantas tratadas com fungicida (RODRIGUES, 2009; FAGAN, 2010; CARRIJO, 2014).

O teor foliar de enxofre reduziu linearmente com o aumento das doses de Ni, quando esse não foi associado ao fungicida. Entretanto, o teor desse nutriente aumentou linearmente quando a aplicação foi associada com a piraclostrobina (Figura 2-F).

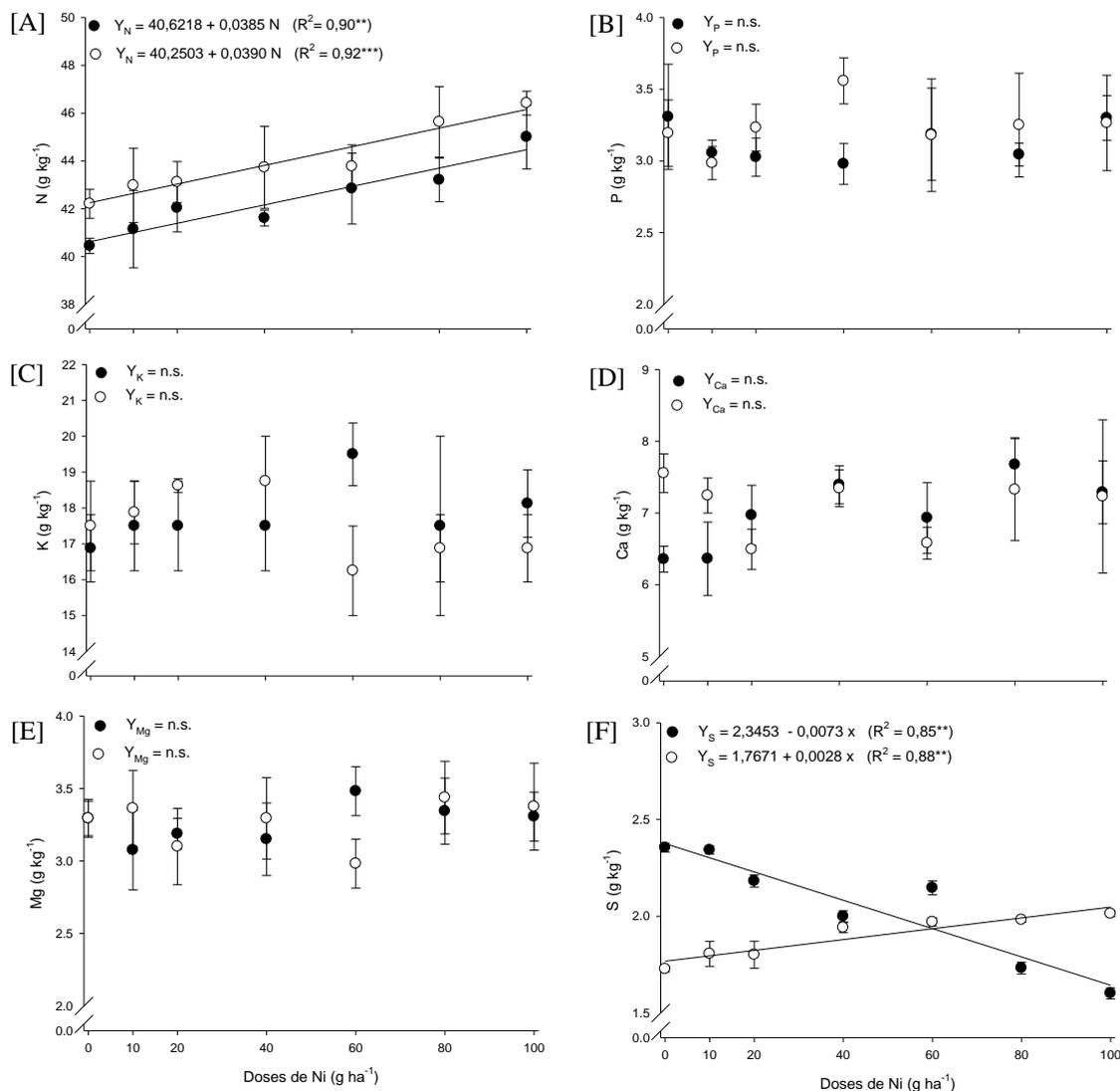
De maneira geral, dados da literatura apontam interações de enxofre com outros nutrientes, como ferro, molibdênio, selênio e zinco (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011), sendo que dados sobre a interação entre Ni e enxofre são escassos e variáveis. Enquanto Lavres, Franco e de Sousa Camara (2016) observou aumento no teor foliar de enxofre com a aplicação de doses de Ni via semente, Rodak (2014) não observou efeito significativo nos teores foliares de enxofre em resposta a aplicação de Ni no solo. Dados sobre o efeito da piraclostrobina sobre o teor foliar de enxofre e a interação desse com utilização de Ni são inexistentes na literatura, demandando a realização de investigações futuras visando sua elucidação.

Apesar disso, vale resaltar que de acordo com Malavolta e Moraes (2007), nitrogênio e enxofre podem sofrer sinergismo. Além disso, a estrutura tridimensional da enzima nitrato redutase contem sulfito oxidases (CAMPBELL, 1999), ou seja, a molécula possui enxofre em sua composição, de forma que alguns estudos constataram redução na atividade da enzima nitrato redutase sob condições de limitação de enxofre (THOMAS et al., 2000; PROSSER et al., 2001). Desse modo, o metabolismo das plantas pode ser alterado de acordo com a forma de nitrogênio combinada com o enxofre na adubação (SILVA; TREVISAN, 2015).

Estudos demonstram que o Ni não exerce influência sobre a enzima nitrato redutase Kevresan et al. (1998) e Rodak (2014), enquanto que o fungicida piraclostrobina aumenta sua atividade, levando a um aumento no teor foliar de nitrogênio nas plantas (RODRIGUES 2009; FAGAN 2010). Assim, a resposta do enxofre aos tratamentos possivelmente ocorreu de maneira indireta através da influência do Ni no teor foliar de nitrogênio e do fungicida sobre a enzima redutase do nitrato. Porém, os efeitos da mesma concentração de Ni podem variar entre

plantas de mesmo gênero, ou mesmo entre plantas de mesma espécie em diferentes cultivares (BARSUKOVA; GAMZIKOVA, 1999; SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006).

**Figura 2-** Concentração de nitrogênio [A]; fósforo [B]; potássio [C]; cálcio [D], magnésio [E] e enxofre [F] em folha diagnose de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.



Legenda: Círculo branco indica a aplicação do Ni associado ao fungicida e o círculo preto indica a aplicação foliar de Ni. As barras de erro indicam o desvio padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Em relação ao teor foliar dos demais macronutrientes (P, K, Ca, Mg) não houve efeito significativo do Ni associado ou não ao fungicida (Figuras 2-B, 2-C, 2-D, 2-E).

Quando aplicado isoladamente, as doses de Ni aumentaram o conteúdo de boro de forma linear crescente, já quando as doses de Ni foram associadas ao fungicida, houve efeito quadrático, com aumento do conteúdo de boro até a dose 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, seguido de redução

do seu conteúdo para as doses superiores (60, 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> Ni associado ao fungicida) (Figura 3-A).

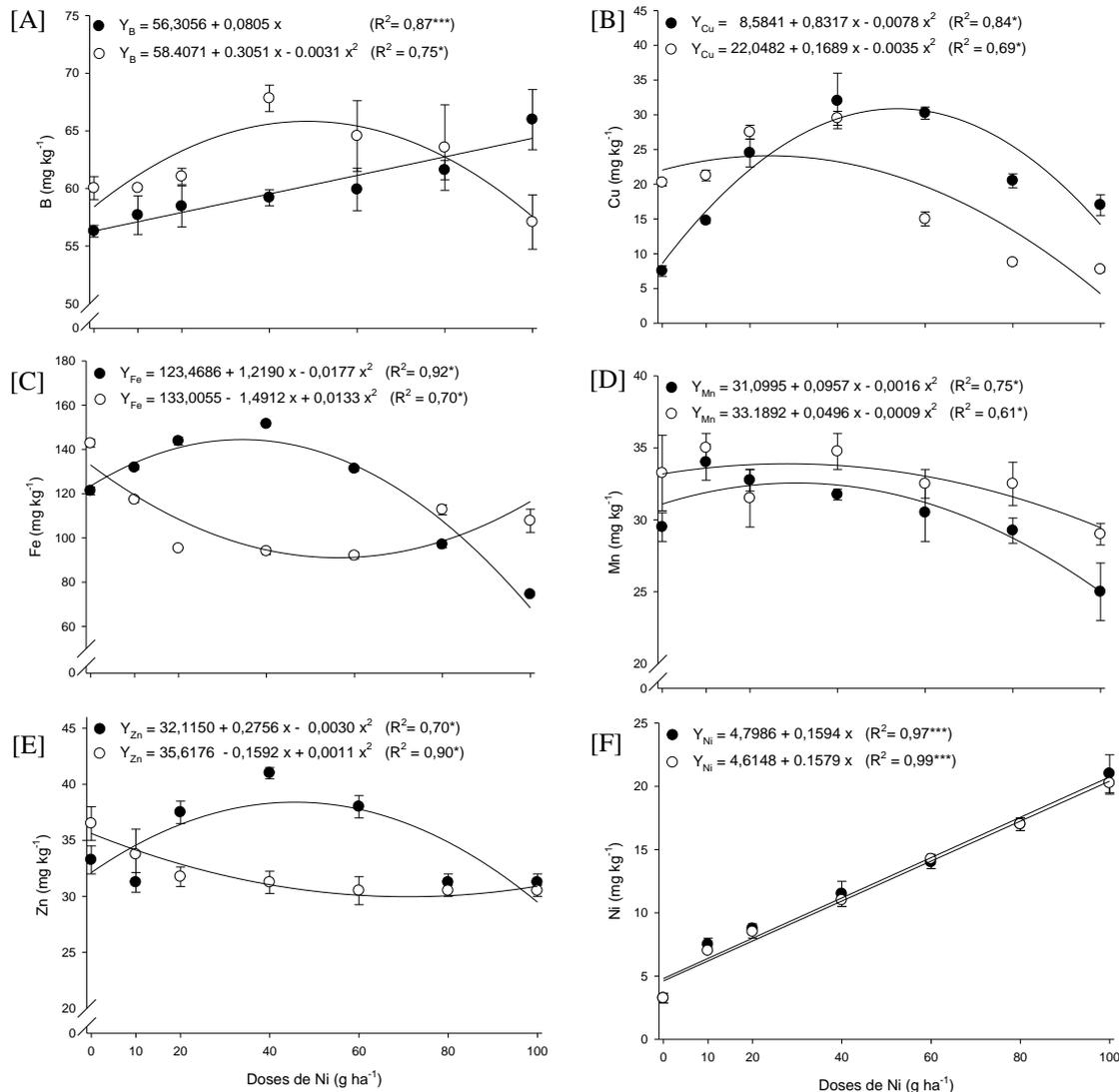
O aumento na concentração foliar de boro em resposta ao aumento de doses de Ni também foi observado por Franco (2015), enquanto que Rodak 2014 observou correlação negativa para os teores de boro e os teores de Ni nos grãos e nas folhas. É pouco conhecido a interação entre o Ni e o B. Interações sinérgicas e antagônicas entre boro e zinco, e de antagonismo entre boro e ferro mais comuns (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011; SILVA; TREVIZAM, 2015).

O conteúdo foliar de cobre apresentou efeito quadrático tanto para a aplicação de doses Ni associado ao fungicida quanto para a aplicação de doses de Ni sem o fungicida (Figura 3-B). Cobre e Ni também podem apresentar efeito antagônico, como demonstrado para plantas de soja (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978), e cevada (KORNER; MOLLER; JENSÉN, 1987), e observado no presente experimento para as doses mais altas de Ni (maiores de 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ao fungicida e maiores de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida). Alguns estudos sugerem que o Ni exerça efeito sinérgico sobre a absorção de cobre (KÜPPER; ANDRESEN, 2016), sendo esse efeito observado em *Alyssum inflatum*, espécie hiperacumuladora Ni (GHASEMI; GHADERIAN; KRÄMER 2009), o mesmo porém não foi observado para outras plantas do gênero *Alyssum* (GHASEMI; GHADERIAN; EBRAZEH 2015).

O conteúdo foliar de ferro apresentou resposta quadrática positiva para a aplicação isolada de doses de Ni, com a maior concentração de ferro nas folhas para a dose de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, sendo superior as concentrações obtidas pelos demais tratamentos associados ou não ao fungicida (Figura 3-C). De maneira geral solos tropicais apresentam elevada disponibilidade de ferro (KÄMPF; MARQUES; CURI, 2012), sendo que trabalhos realizados com Ni em plantas de soja obtiveram aumento na absorção do ferro (RODAK, 2014; FRANCO, 2015).

Porém, no presente trabalho doses de 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem fungicida propiciaram teores foliares de ferro inferiores a testemunha sem Ni. Em plantas cultivadas em solução nutritiva Rahman et al. (2005) verificaram menor absorção de ferro com fornecimento de Ni. O Ni é absorvido pelo sistema de absorção ferro, o que faz com que os dois cátions compitam entre si pelos sítios de absorção (NISHIDA; AISU; MIZUNO, 2012). Esses mesmos autores verificaram que o acúmulo de Ni induz a expressão de IRT1, gene regulador de transporte de ferro 1 e membro da família ZIP, fazendo com que mais Ni seja absorvido através desse transportador.

**Figura 3-** Concentração de boro [A], cobre [B], ferro [C], manganês [D], zinco [E] e níquel [F] em folha diagnose de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.



Legenda: Círculo branco indica a aplicação do Ni associado ao fungicida e o círculo preto indica a aplicação foliar de Ni. As barras de erro indicam o desvio padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

O conteúdo foliar de zinco (Figura 3-E), apresentou resposta semelhante a obtida pelo conteúdo foliar de ferro (Figura 3-C), com efeito quadrático positivo da aplicação de doses de Ni isolada, e efeito quadrático negativo das doses de Ni associadas ao fungicida, sendo que a maior concentração de zinco foi obtida pela aplicação de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida, e a menor concentração de Zn foi obtida pela aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ao fungicida. Quando não foi aplicado Ni a aplicação de piraclostrobina possibilitou maior teor de zinco foliar. O Ni também utiliza os transportadores de zinco, membros da família ZIP, havendo maior acúmulo de Ni em plantas deficientes em zinco (NISHIDA et al., 2015).

De forma semelhante o conteúdo foliar de manganês apresentou resposta quadrática aos tratamentos (Figura 3-D). A concentração foliar de manganês aumentou em resposta aos tratamentos até a dose 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, seguido de redução no conteúdo para as doses superiores (60, 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni), sendo que nos tratamentos em que foi aplicado o fungicida os valores de Mn foram maiores. O Ni também pode estabelecer competição para absorção de manganês, sendo que White (2012), sugere que transportadores da família ZIP também transportem manganês.

Efeito no estado nutricional das plantas com a aplicação de Ni também foram obtidos em plantas de azevém. O teor de Fe aumentou nos brotos submetidos à baixas concentrações de Ni, e diminuiu à concentrações mais elevadas, enquanto que os teores de zinco e manganês diminuíram na presença do Ni (KHALID; TINSLEY, 1980).

Nesse sentido, o teor foliar de zinco apresentou correlação negativa com os teor foliar de Ni ( $r = - 0,86$ ), com o teor de Ni nos grãos ( $r = - 0,79$ ), evidenciando a relação antagônica entre esses dois cátions. O Ni utiliza transportadores não específicos de cátions, como YSL, ZIP/Nramp e nicotianamina sintase, dessa forma, o mesmo pode competir na absorção com os cátions divalentes, com destaque para cobre, ferro, manganês e zinco (DOUCHKOV et al., 2005; MIZUNO et al., 2005; GENDRE et al., 2006).

O teor foliar de Ni aumentou com o aumento das doses de Ni, corroborando com outros trabalhos com a aplicação de Ni em plantas de soja (QUEIROZ, 2012; RODAK, 2014; FRANCO, 2015), sendo esse fator não influenciado pelo uso de fungicida (Figura 3-F).

Segundo Cataldo, Garland e Wildung (1978) na senescência as plantas de soja translocam aproximadamente 70% do Ni para os grãos, corroborando com o resultado obtido no experimento, no qual a correlação entre o teor foliar de Ni e o teor de Ni nas sementes foi de  $r = 0,99$ . Resultado semelhante também foi observado por outros autores (KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2012; RODAK, 2014).

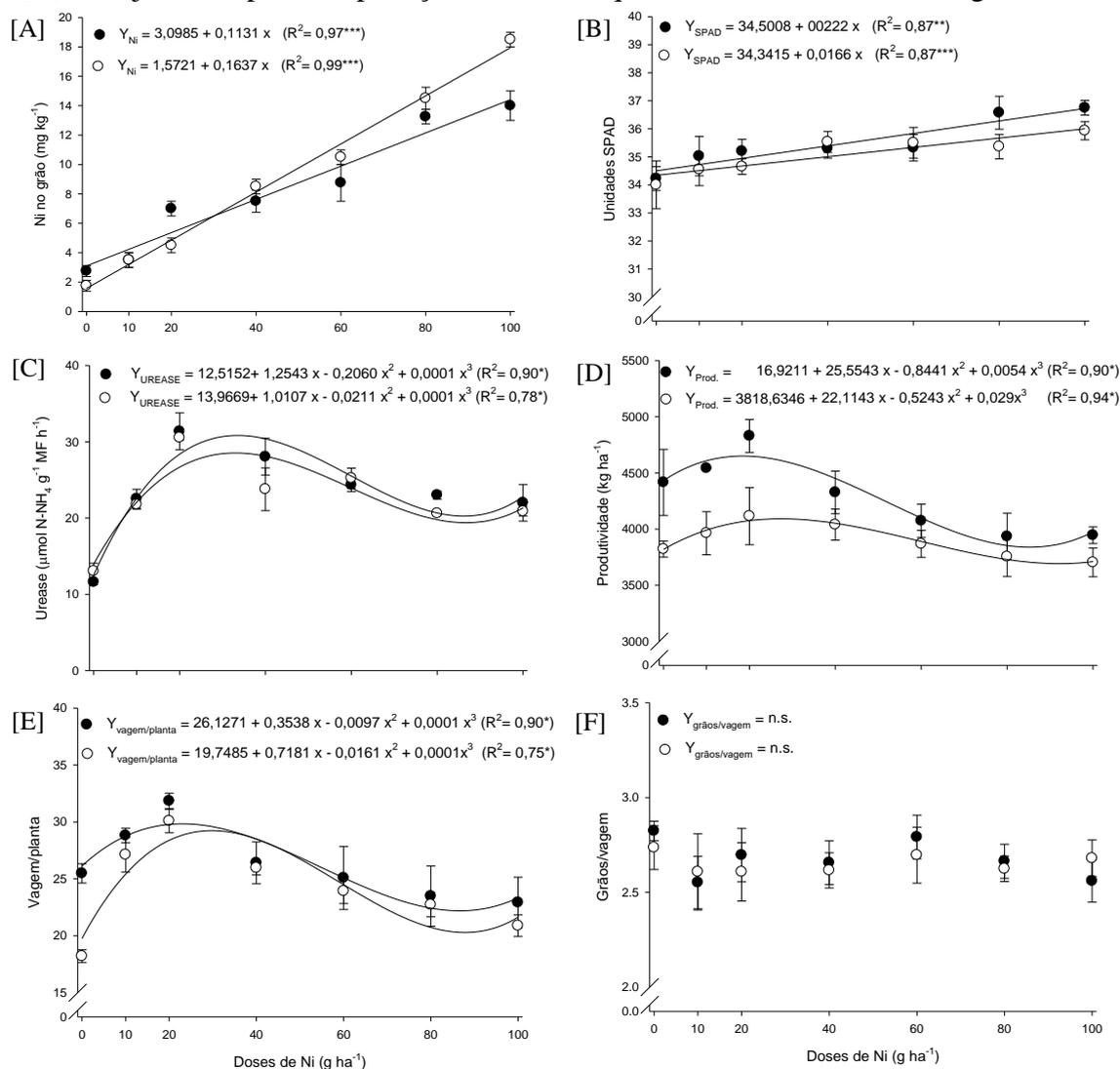
A resposta do teor de Ni nos grãos ao fungicida entretanto foi diferente da obtida para o teor foliar, a partir da dose de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, os tratamentos com fungicida apresentaram valores superiores de Ni nas sementes, demonstrando possível efeito sinérgico do efeito fisiológico da piraclostrobina no acúmulo de Ni nas sementes (Figura 4-A).

O índice SPAD teve comportamento linear em relação as doses de Ni (Figura 4-B). Esse índice estima a quantidade de clorofila presente nas folhas e apresentou relação direta com o teor foliar de nitrogênio ( $r = 0,83$ ). O teor foliar de nitrogênio apresentou correlação positiva com o teor foliar de Ni ( $r = 0,96$ ) e com o teor de Ni nas sementes ( $r = 0,98$ ). O teor

foliar de Ni também apresentou correlação positiva com o índice SPAD ( $r = 92$ ) e com a atividade da enzima urease ( $r = 0,81$ ) (Tabela 1).

Por ser componente da enzima urease, o Ni desenvolve um papel importante na reciclagem do nitrogênio na planta (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015), apresentando um efeito indireto sobre o teor de clorofila e consequentemente sobre o índice SPAD. Por ser componente da enzima urease, o Ni desenvolve um papel importante na reciclagem do nitrogênio na planta (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015), apresentando um efeito indireto sobre o teor de clorofila e consequentemente sobre o índice SPAD.

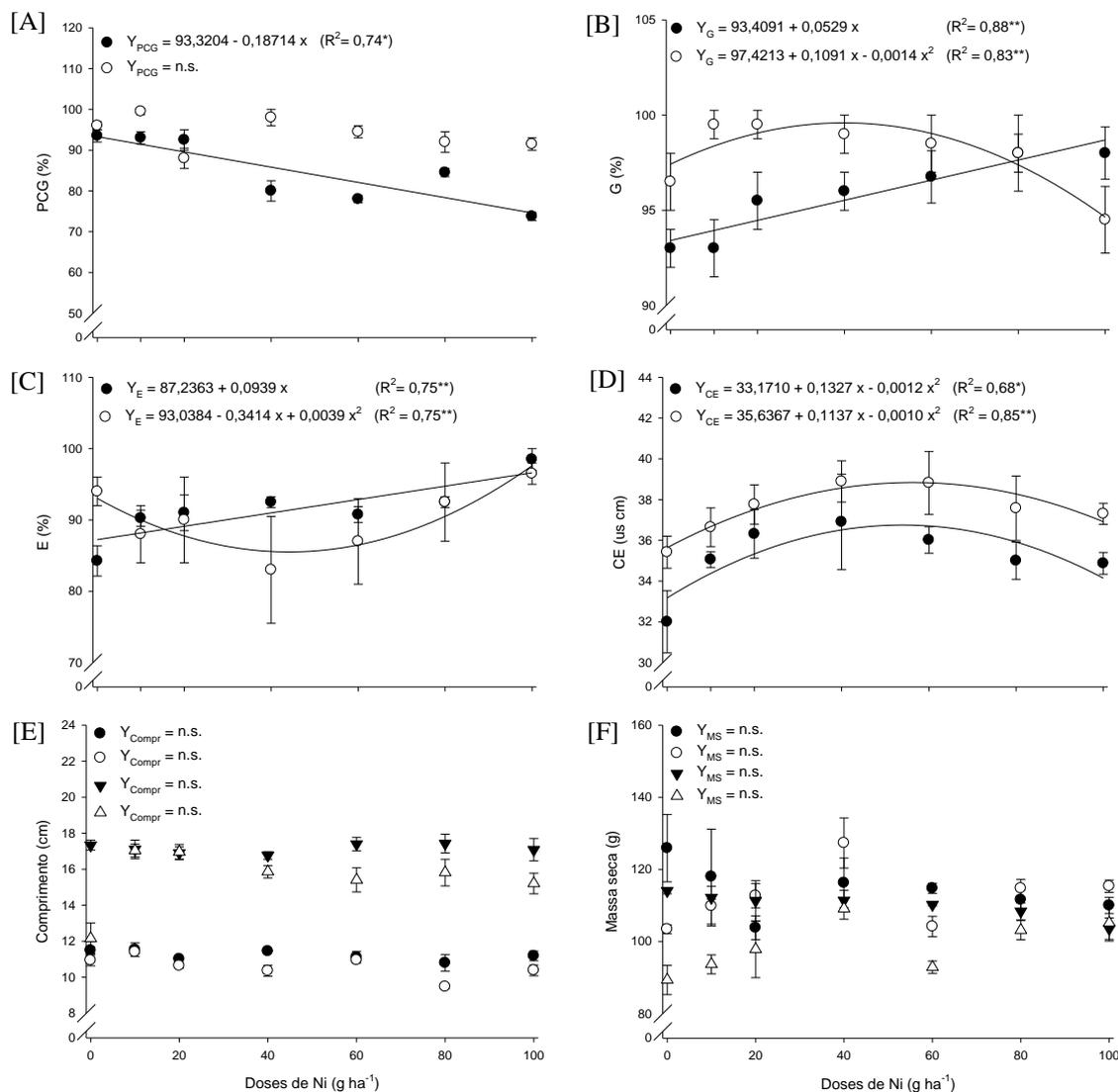
**Figura 4-** Concentração de níquel (Ni) no grão de soja [A], unidades SPAD [B], atividade da urease [C], produtividade [D], número de vagens por planta [E] e número de grãos por vagem [F] de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.



Legenda: Círculo branco indica a aplicação do Ni associado ao fungicida e o círculo preto indica a aplicação foliar de Ni. As barras de erro indicam o desvio padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

**Figura 5-** Primeira contagem da germinação (PCG) [A], taxa de germinação (G) [B], taxa de emergência [C], condutividade elétrica [D], comprimento da plântula [E] e massa seca da plântula (S) [F] de soja em resposta a aplicação foliar de níquel associado ou não ao fungicida.



Legenda: Círculo branco indica a aplicação do Ni associado ao fungicida e o círculo preto indica a aplicação foliar de Ni. As barras de erro indicam o desvio padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Em resposta aos tratamentos, a atividade da enzima urease aumentou até a dose 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni, com o a maior atividade entre as doses 20 e 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, independente da aplicação ou não do fungicida (Figura 4-C), seguido de queda com o aumento das doses de Ni. Resultados semelhante foram obtidos por Rodak (2014), demonstrando que em doses elevadas o Ni acaba inibindo a atividade da enzima. A atividade da enzima urease apresentou correlação com a produtividade de sementes ( $r = 0,88$ ) e número de vagens ( $r = 0,84$ ).

A produtividade (Figura 4-D) e no número de vagens (Figura 4-E) aumentaram com a aplicação de Ni até a dose de 20 g ha<sup>-1</sup>. O número de grãos por vagem não apresentaram efeito significativo para os tratamentos (Figura 4-F).

De acordo com Moraes, Abreu Junior e Lavres Junior (2010), em condições brasileiras, foi observado aumento de até 300 kg ha<sup>-1</sup> de sementes de soja com o fornecimento de 50 g ha<sup>-1</sup> de Ni aplicado via foliar na forma de sulfato de Ni. O aumento na produtividade de sementes de soja pela adição de Ni foliar pode ser atribuído ao efeito do níquel sobre o controle de doenças fúngicas, ocorrendo por tanto de forma indireta (REIS et al., 2014).

Em relação a qualidade fisiológica das sementes, a primeira contagem de germinação (PGC) apresentou ajuste linear decrescente com o aumento das doses de Ni para os tratamentos sem adição de piraclostrobina, e não apresentou efeito significativo para os tratamentos com fungicida (Figura 5-A). Em contrapartida a porcentagem de germinação (Figura 5-B) e a taxa de emergência (Figura 5-C) aumentaram linearmente com o aumento das doses de Ni, para o tratamentos sem fungicida. Porém, quando o Ni foi associado a piraclostrobina a porcentagem de germinação apresentou ajuste quadrático, com aumento da germinação até a dose de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni.

Em um dos poucos estudos que avaliaram a influencia da adubação com Ni na qualidade de sementes Brown, Welch e Cary (1987), observaram que as taxas de germinação de cevada aumentaram de acordo com o nível de Ni fornecida para a planta materna em três gerações precedentes. Enquanto Eskew, Welch e Cary (1983), não observaram efeito do Ni na germinação de sementes.

A condutividade elétrica foi incrementada com as doses de Ni, até a as doses 40 e 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni, com curva semelhante para os tratamentos com e sem fungicida. Entretanto os tratamentos com fungicida apresentaram valores superiores (Figura 5-C). Demonstrando que a aplicação do fungicida teve um efeito sinérgico na deterioração da semente, gerando sementes com maior degradação da membrana.

**Tabela 1-** Correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados nesse estudo

	N	Mn	Zn	Ni-folha	RL	SDW	RDW	SPAD	urease	prod	vagem	Grãos	Ni-semente
<b>N</b>	1												
<b>Mn</b>	<i>ns</i>	1											
<b>Zn</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	1										
<b>Ni-folha</b>	0.96*	<i>ns</i>	-0.86*	1									
<b>RL</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	1								
<b>SDW</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	1							
<b>RDW</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.93*	1						
<b>SPAD</b>	0.83*	<i>ns</i>	-0.90*	0.92*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	1					
<b>urease</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.81*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	1				
<b>prod</b>	<i>ns</i>	0.64*	1										
<b>vagem</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.88*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.88*	0.84*	1		
<b>semente</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0.89*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0.83*	1	
<b>Ni-semente</b>	0.98*	<i>ns</i>	-0.79*	0.99*	<i>ns</i>	1							

Legenda: N – nitrogênio (g kg<sup>-1</sup>); Mn - manganês (mg kg<sup>-1</sup>); Zn – zinco (mg kg<sup>-1</sup>); Ni – níquel (mg kg<sup>-1</sup>); RL – comprimento de raiz (cm); SDW – massa seca da parte aérea (g); RDW – massa seca da raiz (g); SPAD – índice de clorofila; urease (μmol N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup>); produtividade (kg ha<sup>-1</sup>), e número de vagens. *ns* – não significativo \* Significante a 1% de probabilidade de erro (p ≤ 0.0001)

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento de plântula e massa seca de plântulas. Quando avaliadas as correlações de Pearson, a massa seca de parte aérea apresentou correlação positiva com a massa seca de raiz ( $r = 0,93$ ). Piccini e Malavolta (1992) estudando o efeito de tóxico de níquel em plantas de *Phaseolus vulgaris*, observaram que houve redução no crescimento de raiz, bem como considerável efeito inibitório sobre a morfogênese e o tiro de crescimento da planta, sendo que a formação de sementes também foi afetada, efeitos que não foram observados no presente trabalho.

São escassos estudos relacionando o efeito da aplicação de Ni sobre a qualidade fisiológica de sementes, o que torna a necessidade de mais estudos com relação a este parâmetro, já que o conteúdo de reserva da semente exerce grande influência não só na qualidade fisiológica da semente, como observado no presente trabalho, como também em outros fatores fisiológicos da planta adulta (KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2012; RODAK, 2014).

## **6 CONCLUSÃO**

A aplicação de doses de Ni sem a associação com o fungicida apresenta mais benefícios nutricionais em doses elevadas do que quando aplicado Ni associado à piraclostrobina, que aparentemente intensifica os efeitos antagonistas do Ni na nutrição da soja por micronutrientes catiônicos.

A aplicação de 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ou não a piraclostrobina é benéfica a nutrição e produção de sementes de soja. Quando adotado doses superiores a 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni são observados efeitos negativos do Ni em alguns dos parâmetros produtivos, nutricionais ou de qualidade fisiológica de sementes de soja.

## REFERÊNCIAS

- ALCARDE, J. C. A determinação do boro em plantas pelo método colorimétrico da curcumina. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 31-41, 1969.
- ALOVISI, A. M. T.; MAGRI, J.; DUTRA, J. E.; MAGRI, E.; SANTOS, M. J. G.; ALOVISI, A. A. Adubação foliar com sulfato de níquel na cultura da soja. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Valinhos, v. 2, n. 15, p. 25-32, 2011.
- BARSUKOVA, V. S.; GAMZIKOVA, O. I., Effects of nickel surplus on the element content in wheat varieties contrasting in Ni resistance. **Agrokhimiya**, Moscow, v. 1, n. 1999, p. 80–85, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. **Regras para análise de sementes**. Brasília : Mapa/ACS, 2009, 399 p. doi:978-85-99851-70-8
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p. 801-803, 1987.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.
- CARRIJO, D. R. **Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapiraxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. **Plant Physiology**, New York, v. 62, n. 4, p. 5636–5665, 1978.
- CIURLI, S. Electronic structure of the nickel ions in the active site of urease. **Chemistry**, Easton, v. 2001, n. 1, p. 99–100, 2001.
- CUNHA, F. F.; MAGALHÃES, F. F.; CASTRO, M. A. Métodos para estimativa da evapotranspiração de referência para Chapadão do Sul, MS. **Engenharia na agricultura, Viçosa**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 159-172, 2013.
- DOUCHKOV, D.; GRYCZKA, C.; STEPHAN, U. W.; HELL, R.; BÄUMLEIN, H. Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 28, n. 3, p. 365-374, 2005.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja**: Região Central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 15 p. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca>>. Acesso em: 7 abr 2014.
- ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher-plants. **Science**, Washington, v. 222, n. 4624, p. 621-623, 1983.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. **Plant Physiology**, New York, v. 3, n. 76, p. 691-693, 1984.

FABIANO, C. C.; TEZOTTO, T.; FAVARIN J. L.; POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P. Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 6, n. 754, p. 1-4, 2015.

FAGAN, E. B.; DOURADO NETO, D.; VIVIAN, R.; FRANCO, R. B.; YEDA, M. P.; MASSIGNAM, L. F.; OLIVEIRA, R. F.; MARTINS, K. V. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 771-777, dez. 2010.

FRANCO, G. C. **Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da fixação biológica e atividade da urease**. 2015. 67 ff. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo Universidade de São Paulo-USP, Piracicaba, 2015.

GENDRE, D.; CZERNIC, P.; CONÉJÉRO, G.; PIANELLI, K.; BRIAT, J. F.; LEBRUN, M.; MARI, S. TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine Ni/Fe transporter. **The Plant Journal**, Malden, v. 49, n. 1, p. 1-15, 2007.

GHASEMI, R.; GHADERIAN, S. M.; KRÄMER, U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 184, n. 3, p. 566-580, 2009.

GHASEMI, R.; GHADERIAN, S. M.; EBRAZEH, S. Nickel stimulates copper uptake by nickel-hyperaccumulator plants in the genus *Alyssum*. **Australian Journal of Botany**, Clayton South, v. 63, n. 2, p. 56-64, 2015.

GODOY, C. V.; MEYER, M. C. **Resistência a fungicidas na cultura da soja**. Londrina: Fundação Meridional de Apoio à Pesquisa Agropecuária, 2014. Artigo. Disponível em: <<http://fundacaomeridional.com.br/artigos/2014/11/10/resistencia-a-fungicidas-na-cultura-da-soja>> Acesso em: 20 jan. 2015.

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 22, n.3, p.663-667, 1983.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles: University of California, 1956. v. 766, n. 1, p. 32-33.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 4. ed. Boca Raton: CRC, 2011. v. 4, 520 p.

KÄMPF, N.; MARQUES, J. J.; CURI, N. Mineralogia de solos brasileiros. In: KER, J. C.; CURI, N.; SCHAEFER, C. E. G. R.; TORRADO-VIDAL, P. (Ed.). **Pedologia**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2012. 343 p.

KAPPES, C.; GOLO, A. L.; DE CARVALHO, M. A. C. Doses e épocas de aplicação foliar de boro nas características agrônômicas e na qualidade de sementes de soja. **Scientia agraria**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 291-297, 2008.

KEVRESAN, S.; PETROVIC, N.; POPOVIC, M.; KANDRAC, J. Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. **Biologia Plantarum**, Netherland, v. 41, n.2, p. 235-240, 1998.

KHALID, B. Y.; TINSLEY, J. Some effects of nickel toxicity on rye grass. **Plant and Soil**, Netherland, v. 55, n. 1, p. 139-144. 1980.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A., EVANS, H. J. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 8, n. 80, p. 2253-2257, 1983.

KORNER, L. E.; MOLLER, L.; JENSÉN, M., P. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and other divalent cations on uptake of  $\text{Ni}^{2+}$  by excised barley roots. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 71, n. 1, p. 49-54. 1987.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, London, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016. DOI: 10.1039/C5MT00244C.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 1007, n. 1-2, p.115, 2012.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate fed soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 376, n. 1-2, p. 261-276, 2013a.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Foliar nickel application alleviates detrimental effects of glyphosate drift on yield and seed quality of wheat. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 61, n. 35, p. 8364-8372, 2013b.

LAVRES, J.; FRANCO, G. C.; DE SOUSA CÂMARA, G. M. Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 4, n. 1, p. 37, 2016.

LIMA, J. D. MORAES, W. D. S.; DA SILVA, M. G.; HELENA, S. Respostas fisiológicas em mudas de bananeira tratadas com estrobilurinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 77-85, 2012.

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

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Nickel - from toxic to essential nutrient. **Better Crops**, Peachtree Corners, v. 91, n. 3, p. 26-27, 2007.

MARCOS FILHO, J.M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

McCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica Chimica Acta**, Netherland, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MIZUNO, T.; USUI, K.; HORIE, K.; NOSAKA, S.; MIZUNO, N.; OBATA, H. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, n. 8, p. 793-801, 2005.

MORAES, M. F.; ABREU JUNIOR, C. H.; LAVRES JUNIOR, J. Micronutrientes. In.: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (Ed.). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. v. 2, p. 205-278.

NISHIDA, S.; AISU, A.; MIZUNO, T. Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. **Plant signaling & behavior**, Behav, v. 7, n. 3, p. 329–331. 2012.

NISHIDA, S.; KATO, A.; TSUZUKI, C.; YOSHIDA, J.; MIZUNO, T. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 5, p. 9420-9430, 2015.

PETIT, A. N.; FONTAINE, F.; PARUL, V.; CHRISTOPHE, C. M.; NATHALIE, V. G. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 111, n. 1, p. 315 - 326, 2012.

PICCINI, D. F., MALAVOLTA, E., Effect of nickel on two common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 15, n. 11, p. 2343-2350, 1992.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion—nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant science**, Netherland, v. 199, n. 1, p. 79-90, 2013.

PROSSER, I. A.; PURVES, J. V.; SAKER, L. R.; CLARKSON, D. T. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 354, p. 113-121, 2001.

QUEIROZ, C. S. **Níquel, outros micronutrientes e silício e a ferrugem asiática (*Phakopsora Pachyrhizi*) na cultura da soja (*Glycine Max*)**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

RAHMAN, H.; SABREEN, S.; ALAM, S.; KAWAI, S. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 393-404, 2005.

REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 1, n. 147, p. 10-24. 2014.

RODRIGUES, M. A. T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2009.

SÁ, M. E. Importância da adubação na qualidade de sementes. In: SÁ, M. E.; BUZETTI, S. (Eds.) **Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas**. São Paulo: Ícone, 1994. p. 65-98.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.

SILVA, M. L. S.; TREVIZAM, A. R. Interações iônicas e seus efeitos na nutrição de plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 1, n. 149, p. 10-16. 2015.

SILVA, T. A. da; DA SILVA, P. B.; DA SILVA, E. A. A.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Condicionamento fisiológico de sementes de soja, componentes de produção e produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 2, p. 227-232, 2016.

SOIL SURVEY STAFF. **Soil taxonomy**: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2. ed. United States: Department of Agriculture. 1999. 436 p.

TAN, X. W.; IKEDA, H.; ODA, M. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 84, n. 3, p. 265-273, 2000.

THOMAS, S. G.; BILSBORROW, P. E.; HOCKING, T. J.; BENNETT, J. Effect of sulphur deficiency on the growth and metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* cv Druid). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 80, n. 14, p. 2057-2062, 2000.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-26.

WALKER, C. D.; GRAHAM, R. D.; MADISON, J. T.; CARY, E. E.; WELCH, R. M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, New York, v. 79, n. 2, p. 474-479, 1985.

WHITE, P. J. Long-distance transport in the xylem and phloem. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic Press, 2012. 49-70 p.

WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, Netherland, v. 180, n. 3, p. 431-438, 2011.

ZONIA, L. E.; STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Physiology**, New York, v. 107, n. 4, p. 1097-1103, 1995.

### CAPÍTULO III

#### Níquel no controle do oídio (*Erysiphe diffusa*) em plantas de soja

##### RESUMO

A ocorrência de doenças fúngicas é o principal fator limitante da produtividade da soja. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o papel fisiológico do níquel (Ni) no controle do oídio na soja. O delineamento experimental foi blocos ao acaso em esquema fatorial 7 x 2, sendo 7 doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associados ou não ao fungicida (Fluxapiraxade + Piraclostrobina) aplicados na fase fenológica R1 da soja. As imagens de microscopia eletrônica revelam que as doses de Ni aplicadas não provocou fitotoxicidade e nem alterações ultraestruturais na folha. Os teores de Ni aumentaram aproximadamente 10 vezes nas folhas (de 3,8 a 38,0 mg kg<sup>-1</sup>) e 6 vezes nos grãos (de 3,0 a 18,0 mg kg<sup>-1</sup>) em função das doses de Ni aplicadas. Houve correlação altamente significativa entre os teores de Ni nas folhas e grãos ( $r = 0,93$ ,  $p < 0,0001$ ) indicando a alta translocação do elemento. O tratamento 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado a 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do fungicida reduziu a severidade do oídio a 99%, e nesse tratamento foram observadas atividades máximas das enzimas urease, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). A atividade da urease teve alta correlação estatística ( $p < 0,0001$ ) com a SOD ( $r = 0,71$ ), CAT ( $r = 0,57$ ), POD ( $r = 0,56$ ) e relação negativa com % de severidade do fungo ( $r = -0,47$ ,  $p < 0,0001$ ). Além disso, a SOD e CAT apresentou correlação negativa com a severidade do fungo ( $r = -0,34$ ,  $p < 0,0001$ ) e ( $r = -0,35$ ,  $p < 0,0001$ ), respectivamente. O teor de Ni foliar apresentou correlações positivas com a urease ( $r = 0,29$ ,  $p < 0,01$ ) e negativas com a % de severidade do fungo ( $r = -0,39$ ,  $p < 0,0001$ ). Portanto, urease, SOD e CAT são enzimas chaves reguladas pelo Ni na redução da severidade do oídio na soja.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidativas. Urease. Ureia. Fungicidas. Níquel e soja.

## Nickel on the control soybean powdery mildew (*Erysiphe diffusa*)

### ABSTRACT

The occurrence of fungal diseases in soybean crop is the main yield limiting step. This study aimed to evaluate the physiological role of Ni on powdery mildew control in soybean plants. The experimental design was randomized plots in factorial scheme 7 x 2, where; 7 levels of Ni (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 g ha<sup>-1</sup>) combined or not with fungicide (Fluxapyroxad + Pyraclostrobin), applied to soybeans plants during R1 phenological stage of development. The electron microscopy images showed no effect of Ni levels application on phytotoxicity or ultrastructural changes in leaf tissues. Leaf Ni concentration ranged from 3.8 to 38.0 mg kg<sup>-1</sup> and grains Ni concentration ranged from 3.0 to 18.0 mg kg<sup>-1</sup> in response to foliar Ni application. There was highly significant correlation between Ni concentration in leaves and grains ( $r = 0.93$ ,  $p < 0.0001$ ), indicating a high translocation of Ni from leaves to grains. The application of 60 g ha<sup>-1</sup> Ni combined with 300 mL p.c. fungicide ha<sup>-1</sup> reduced the powdery mildew severity up to 99%. In addition, the highest enzymatic activities of urease, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) were observed. The urease activity showed high statistical correlation ( $p < 0.0001$ ) with SOD ( $r = 0.71$ ), CAT ( $r = 0.57$ ), POD ( $r = 0.56$ ) and negative relationship with powdery mildew severity ( $r = -0.47$ ,  $p < 0.0001$ ) in soybean plants. In addition, SOD and CAT was negatively correlated with powdery mildew severity ( $r = -0.34$ ,  $p < 0.0001$ ) and ( $r = -0.35$ ,  $p < 0.0001$ ), respectively. The leaf Ni concentration showed positive correlations with urease ( $r = 0.29$ ,  $p < 0.01$ ) and negative with powdery mildew severity ( $r = -0.39$ ,  $p < 0.0001$ ). Therefore, urease, SOD and CAT are key enzymes regulated by Ni responsible for decrease powdery mildew severity in soybean plants.

**Key-words:** Antioxidative enzymes. Urease. Urea. Fungicides. Nickel. Soybean.

### 3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) vêm apresentando contínuos ganhos produtivos, devido a melhorias genéticas e de manejo. No Brasil, segundo maior produtor mundial (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA, 2016), as principais práticas de manejo adotadas são a fertilização com macro e micronutrientes, bem como o controle efetivo de pragas e doenças (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

A ocorrência de doenças é um dos fatores mais limitantes para obtenção de maiores produtividades da soja (BARBOSA et al., 2014). O oídio causado pelo fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam, desenvolve-se na superfície foliar, formando uma fina camada de micélio (XAVIER et al., 2015), reduz a área fotossintética ativa da planta em até 50%, levando ao secamento e queda prematura das folhas em casos severos (PEREIRA, 2015), ocasionando perdas no rendimento que variam de 10 a 40% (PEREIRA, 2015).

O método mais eficiente de controle do oídio consiste no uso de cultivares resistentes, no entanto, mesmo algumas cultivares consideradas resistentes, quando semeadas nas épocas mais favoráveis a ocorrência do oídio se tornam suscetíveis (GRIGOLLI, 2014), tornando necessária a aplicação de fungicidas.

Recomenda-se a utilização de misturas com pelo menos dois ingredientes ativos de ação distinta afim de evitar a resistência fúngica aos produtos químicos (GODOY; MEYER, 2014), entre elas a mistura de estrobilurina e carboxamida. Ambos ingredientes ativos bloqueiam a respiração mitocondrial do fungo, atuando porém sobre sítios distintos. Além disso, essas moléculas são conhecidas por exercerem efeito fisiológico positivo sobre metabolismo antioxidante das plantas, contribuindo tanto contra o estresse biótico quanto ao abiótico sofrido (CARRIJO, 2014; JACOBELIS JUNIOR, 2015).

Uma alternativa economicamente viável para o controle dessa doença, que necessita ser investigada, é a fertilização foliar com micronutrientes, como o níquel (Ni), em associação ou não com fungicidas. Uma vez que, o estado nutricional da planta pode determinar sua maior ou menor suscetibilidade a doença (DATNOFF et al., 2015). O Ni teve sua essencialidade comprovada por Dixon et al. (1975) ao constatar que esse metal é componente estrutural da metaloenzima urease (EC 3.5.1.5., ureia amidohidrolase), apresentando dois íons de Ni em seu centro ativo (CIURLI, 2001). Essa enzima catalisa a hidrólise da ureia em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (DIXON et al., 1975). Em plantas, sua essencialidade foi confirmada nos estudos de Eskew, Welch e Cary (1983), Eskew, Welch e Norvell (1984) e Brown et al. (1987), que verificaram uma baixa atividade da urease em soja,

feijão e cevada em decorrência da deficiência de Ni, resultando em acúmulo de ureia no tecido foliar. A urease ocorre em duas formas isoenzimáticas nas plantas de soja, uma de alta expressão denominada "urease embrião-específica", sintetizada na semente, e a outra, a "urease ubíqua", sintetizada nos demais tecidos da planta, desempenhando importante papel no metabolismo do nitrogênio (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015).

Além dos efeitos nutricionais do Ni sobre o metabolismo do nitrogênio, esse micronutriente pode afetar diretamente os microrganismos patogênicos, como já relatado para bactérias (WANG et al., 1999), fungos (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007; WIEBKE-STROHM et al., 2012). Pulverizações foliares com Ni em baixas doses, também aumentam a tolerância ao estresse biótico e abiótico nas plantas, uma vez que esse micronutriente é elicitador do metabolismo antioxidante elevando a atividade de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, entre elas a catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), que protegem as células das plantas contra radicais livres (GONZÁLEZ et al., 2015).

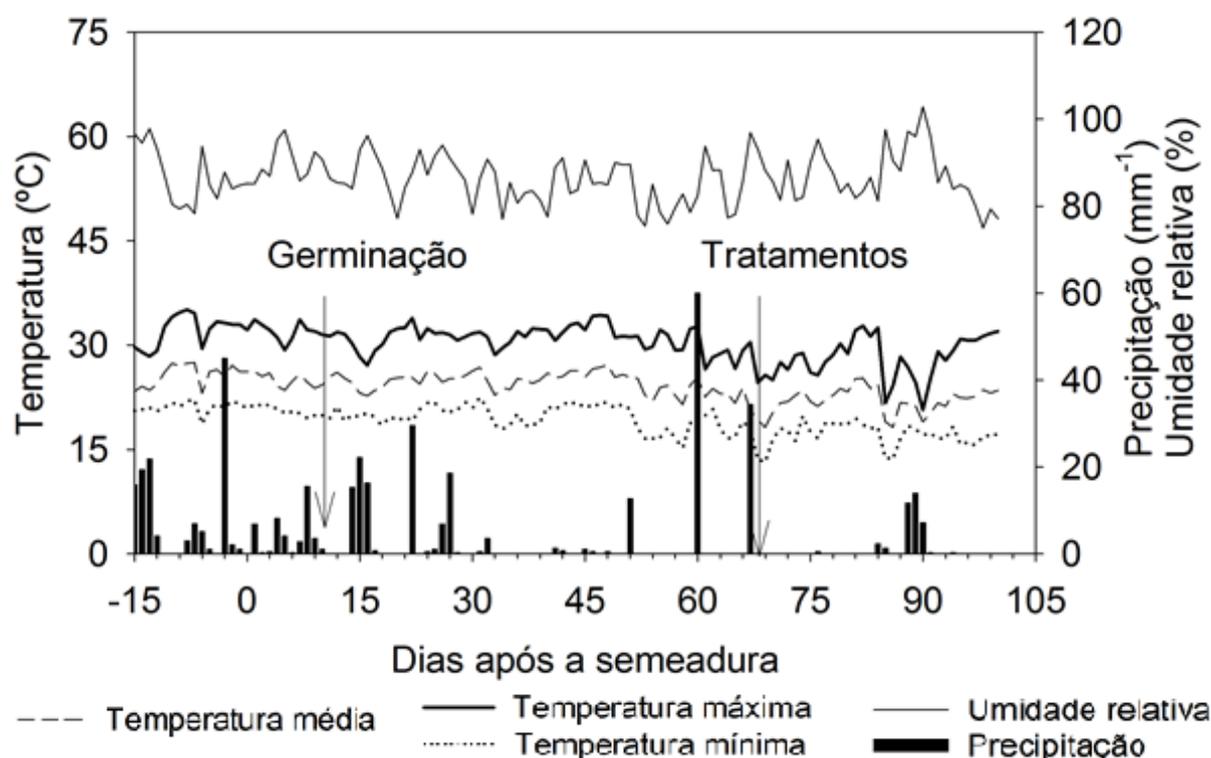
Nesse contexto, aplicação de Ni foliar isolada ou aliada ao controle químico com fungicidas pode ser uma alternativa viável no manejo do oídio na cultura da soja. Para tal, o objetivo desse estudo foi verificar o efeito do Ni, associado ou não ao controle químico com fungicida, no controle de oídio e suas relações com o estado nutricional, estresse antioxidativo e metabolismo secundário em plantas de soja.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL**

O estudo foi conduzido de março a junho de 2015 na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), localizada em Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil (20° 22' S e 51° 22' W, altitude de 335 m). A área experimental pertence ao bioma Cerrado, sendo cultivada há mais de 25 anos e nos últimos 10 anos em sistema de plantio direto. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, tropical úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A precipitação média anual é 1.232 mm, e a temperatura média anual é 24,5°C (HERNANDEZ; LEMOS FILHO; BUZETTI, 1995). Durante a condução do experimento a temperatura diária média variou entre 27,2 °C e 15,3 °C, a precipitação média foi de 3,0 mm e a umidade relativa média de 86%, e estão representados na Figura 1.

**Figura 1-** Dados climáticos de precipitação (mm), umidade relativa do ar (%) e temperatura mínima, média e máxima (°C) durante o desenvolvimento do experimento. O experimento foi instalado próximo à estação meteorológica da Fazenda Experimental de Pesquisa e Ensino da Universidade Estadual Paulista localizada no município de Selvíria-MS, Brasil.



Fonte: elaboração do próprio autor.

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico (LVd) muito argiloso, e corresponde a ordem *Oxisol* (SOIL SURVEY STAFF, 1999). A análise de solo foi realizada segundo metodologia de Raij et al. (2001) e apresentava as seguintes características químicas: fósforo(resina) 29 mg dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica 21 g dm<sup>-3</sup>; pH cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 5,3; potássio 3,5 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; cálcio 38 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; magnésio 22 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H<sup>+</sup> + Al mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; alumínio 0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; níquel 0,1 mg dm<sup>-3</sup>; capacidade de troca catiônica 92,5 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e saturação de bases (V%) - 69%.

#### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O estudo foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 7 x 2, sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) utilizando como fonte sulfato de níquel, associadas ou não a dose de 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> fungicida Fluxaproxade + Piraclostrobina (Orkestra® SC), aplicados durante estágio fenológico R1 (RITCHIE; HANWAY; THOMPSON, 1997) com quatro repetições, totalizando 56 parcelas. As doses de

Ni utilizadas no experimento foram baseadas nos trabalhos realizados por Queiroz (2012) e Rodak (2014). Foi escolhido o fungicida Orkestra® SC por possuir registro no Ministério da Agricultura e Pecuária para o controle de doenças da soja, entre elas o oídio. Além disso, é o único fungicida utilizado recentemente que apresenta os ingredientes ativos de interesse para o estudo por sua conhecida ação fisiológica sobre a planta (Fluxapiraxade + Piraclostrobina).

#### 4.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido em sistema de plantio direto. A correção da acidez do solo não foi realizada visto que a saturação de bases encontrava-se adequado para as exigências da soja. Foi efetuada dessecação da área, 20 dias antes da semeadura, com Roundup Original (glifosato) (4,0 L ha<sup>-1</sup>), Aurora 400 EC (carfentrazona-etílica) (200 mL ha<sup>-1</sup>) e 0,5% de óleo mineral.

O cultivar de soja TMG 7062 IPRO (crescimento semi determinado, flor branca, ciclo curto, suscetível a oídio, tecnologia INOX® e Intacta RR2 PRO™) previamente tratado com StandakTop® (2 mL p.c. kg<sup>-1</sup> de semente) foi semeado com densidade de aproximadamente 267.000 plantas ha<sup>-1</sup>. As parcelas experimentais consistiram de quatro linhas de 6 m espaçadas 0,45 m, sendo a área útil as duas linhas centrais, excluindo-se 0,5 m das extremidades.

Concomitantemente as sementes foram inoculadas com 3 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do produto comercial líquido com bactérias fixadoras de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum*. Para adubação de semeadura com NPK foi aplicado 350 kg ha<sup>-1</sup> do formulado 4-30-10.

O experimento foi semeado no dia 05 de março de 2015, e as plântulas emergiram 7 dias após o plantio, no dia 12 de março de 2015. A realização de semeaduras tardias ou safrinha e cultivo no inverno são épocas mais favoráveis à ocorrência do oídio, isso porque o fungo necessita de temperaturas em torno de 18-24 °C e baixa umidade relativa do ar para seu desenvolvimento (GRIGOLLI, 2014; PEREIRA, 2015).

Quando necessário, a irrigação foi realizada por um sistema de aspersão do tipo pivô central, com lâmina de água média de 14 mm e turno de rega de 72 h. Durante o ciclo de desenvolvimento das plantas o controle fitossanitário foi efetuada com Roundup Original (glifosato) (4,0 L ha<sup>-1</sup>), Premio (clorantraniliprole) (50 mL ha<sup>-1</sup>), Belt (flubendiamida) (60 mL ha<sup>-1</sup>) e Connect (imidacloprido + beta-ciflutrina) (0,8 L ha<sup>-1</sup>).

O uso de cultivar suscetível ao oídio, aliado ao histórico da área que é favorável ao aparecimento natural da doença, e ao período e condições climáticas ideias para o seu

desenvolvimento foram suficientes para a ocorrência natural do oídio, dispensando a necessidade de inoculação.

#### 4.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

##### 4.4.1 Avaliações do crescimento e produtividade

No estágio R8 foi avaliado o número de vagens das plantas, excluindo-se as vagens não granadas. A avaliação foi realizada em três plantas da área útil de cada parcela.

Nesse mesmo estágio foi efetuada a avaliação da produtividade colhendo-se as plantas da área útil. Efetuou-se também a determinação do peso de 100 grãos. A umidade foi padronizada em 13%.

##### 4.4.2 Avaliação da severidade da doença

A severidade da doença foi avaliada através de sistema de notas, considerando-se a porcentagem de área foliar com sintomas visíveis da doença, avaliada com auxílio de escala diagramática (MATTIAZZI, 2003).

##### 4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

No estágio R2, doze dias após a aplicação dos tratamentos, amostras das folhas do terço superior de uma planta de cada parcela foram coletadas. Após efetuar cortes de quadrados de aproximadamente  $0,5 \text{ mm}^2$ , as amostras foram submetidas a banho de ouro por cerca de três minutos na metalizadora Quorum (modelo Q150T). Em seguida, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, EVO LS-15), onde obteve-se imagens utilizando detectores de elétrons secundários (para observar o relevo e topografia das folhas), bem como detectores de elétrons retro espalhados (para observar o contraste nas folhas, devido a presença de elementos químicos de diferentes números atômicos).

##### 4.4.4 Análise nutricional

No estágio R2, doze dias após a aplicação dos tratamentos, foi coletado o primeiro trifólio recém expandido de 20 plantas de cada parcela. O material, após seco, foi utilizado para quantificar os teores foliares dos macro e micronutrientes. Os grãos coletados em R8 também foram analisados.

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl, após digestão sulfúrica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Para quantificação dos demais nutrientes efetuou-se digestão nitroperclórica (JOHNSON; ULRICH, 1959). A

determinação foi realizada em espectrofotometria de absorção atômica, com exceção do fósforo e enxofre determinado em espectrofotometria e do potássio fotometria de chama.

#### **4.4.5 Índice de clorofila**

No estágio R2, foram realizadas medições indiretas de clorofila com um medidor eletrônico portátil de intensidade da cor verde das plantas (SPAD), modelo Digital SPAD 502 (MINOLTA). A leitura foi efetuada em três plantas de cada parcela, em cinco pontos da terceira folha da haste principal do terço superior.

#### **4.4.6 Análises enzimáticas**

##### **4.4.6.1 Coleta do material**

Foi coletado o primeiro trifólio totalmente expandido das plantas para quantificação da atividade das enzimas urease (EC 3.5.1.5.), dez dias após a aplicação dos tratamentos, no estágio R2, que foram condicionados em gelo até realização da análise.

Uma segunda coleta foi realizada aos 11 dias após a aplicação dos tratamentos, no estágio R2, sendo coletado o primeiro trifólio totalmente expandido de 15 plantas de cada parcela, que foram condicionados em nitrogênio líquido, e utilizados para quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, conteúdo de ureia, conteúdo de ácido chiquímico, teor de proteína solúvel, superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Esse material foi macerado em N líquido e armazenado em freezer -80 °C até serem processadas as análises.

##### **4.4.6.2 Atividade da urease (EC 3.5.1.5)**

A atividade da urease foi determinada em função da produção de N-NH<sub>4</sub>, segundo metodologia de McCullough (1967) e o extrato foi obtido segundo metodologia descrita por Hogan, Swift e Done (1983). Após a coleta, 0,2 g da massa fresca foliar foi inserida em 8 mL de tampão fosfato de sódio com ureia pH 7,4 e foram mantidos em banho-maria a 30 °C com agitação durante 3 horas para extração. A uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionado 2,5 mL do reagente I: fenol (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e nitroprussiato de sódio (SNP) (170 µmol L<sup>-1</sup>), seguido de agitação, e em seguida 2,5 mL do reagente II: hidróxido de sódio (0,125 mol L<sup>-1</sup>), fosfato dissódico (0,15 mol L<sup>-1</sup>) e hipoclorito de sódio (3% Cl<sub>2</sub>). Efetuou-se nova incubação em banho-maria a 37 °C por 35 minutos. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em µmol N-NH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup>.

#### **4.4.6.3 Conteúdo de peróxido de hidrogênio**

O conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi determinado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). Foram pesados 100 mg do material vegetal congelado, ao qual foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% em eppendorf, esse material foi homogeneizado através de agitação em vortex e em seguida foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos, a 4 °C em centrífuga refrigerada. A 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 800  $\mu\text{L}$  de solução de KI (1M). As amostras foram mantidas em gelo durante uma hora. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram realizadas leituras de absorvância a 390 nm. O conteúdo de peróxido de hidrogênio no tecido foliar foi calculado com base numa curva padrão e os resultados expressos em  $\text{nmol g}^{-1}$  MF.

#### **4.4.6.4 Peroxidação lipídica**

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído, segundo metodologia de Heath e Packer (1968). A extração foi realizada pela homogeneização de 200 mg de material vegetal em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) + polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20%. O material homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. A 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado 1 mL de solução de ácido tricloroacético 20% + 0,5% de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram mantidas em banho-seco a 95 °C durante 30 minutos, e em seguida transferida para gelo onde permaneceu por mais 10 minutos. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 minutos. Foram realizadas leituras das amostras em dois comprimentos de onda, uma a 532 nm e outra a 600 nm. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol MDA g}^{-1}$  MF.

#### **4.4.6.5 Determinação de ureia**

A quantidade de ureia foi determinada como descrito em Kojima et al. (2007). Foi adicionado a 0,5 g de material vegetal 1 mL de ácido fórmico (10 mM) seguido de agitação em vortex e centrifugação a 13200 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos. Primeiramente foram preparados reagentes que dariam origem ao reagente final para a determinação, sendo um reagente ácido contendo cloreto férrico hexahidratado, e ácido ortofosfórico, que ao ser misturado com ácido sulfúrico, formou o reagente ácido misto; e dois reagentes colorimétricos, um contendo tiosemicarbazida, e o outro contendo diacetilmonoxime, da

mistura dos dois reagentes colorimétricos obtém-se o reagente colorimétrico misto. O reagente final, chamado reagente desenvolvedor de cor, foi preparado somente no dia do ensaio, através da mistura de água ultrapura, do Reagente Ácido Misto e do Reagente Colorimétrico Misto, nas proporções de 1:1:1. Para a determinação, foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  da amostra, aos quais foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  do reagente preparado. Eles foram incubados a 99  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, sob agitação a 750 rpm, e em seguida foram esfriados por 5 minutos em gelos e mantidos em ambiente escuro. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol ureia g}^{-1}\text{ MF}$ .

#### ***4.4.6.6 Determinação do ácido chiquímico***

Para a determinação de ácido chiquímico foi utilizado o método descrito por Singh e Shaner (1998). Para isso, foi adicionado a 250 mg do material vegetal, 750  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico (0,25 N), numa proporção de 1:3. O material foi homogeneizado através de agitação em vortex e em seguida foi levado para centrifugação a 14.000 rpm, a 4  $^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. A 20  $\mu\text{L}$  da amostra foram misturados 0,5 mL de solução de ácido periódico (1%). A solução ficou descansando durante 3 horas. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de hidróxido de sódio (1N), e 0,3 mL de glicina (0,1M). As leituras foram realizadas imediatamente em espectrofotômetro a 380 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol de ácido chiquímico g}^{-1}\text{ MF}$ .

#### ***4.4.6.7 Extração de proteínas e enzimas antioxidantes***

O material vegetal armazenado em freezer -80  $^{\circ}\text{C}$ , foi macerado em nitrogênio líquido em um almofariz. Posteriormente, o extrato foi obtido aproximadamente 0,3 g de material vegetal processado, o qual foi transferido para tubos falcon de 15 mL, onde foi adicionado 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8, contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 3 mM, e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 4% (p/v), utilizando metodologia adaptada de (GOMES JUNIOR et al., 2007). O material foi homogeneizado em mixer e em seguida foi centrifugado em centrífuga refrigerada à 9.000 rpm por 20 minutos à 4  $^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para eppendorfs, e posteriormente utilizado para quantificação de proteínas e da atividade das enzimas antioxidativas.

#### ***4.4.6.8 Determinação de proteínas***

A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Foram

pipetados em tubos de ensaio 100  $\mu\text{L}$  da alíquota e 5 mL do reagente Bradford, que havia sido preparado previamente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em  $\text{mg proteína g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### **4.4.6.9 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada de acordo com (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A reação foi conduzida em câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, a 25 °C. Foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  da amostra a 5 mL da solução: tampão fosfato de sódio pH 7,8 (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ), metionina (13  $\text{mmol L}^{-1}$ ), nitroblue tetrazólio (NBT) (75  $\text{mmol L}^{-1}$ ), EDTA (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e riboflavina (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). As amostras foram acondicionadas na caixa, tampada e livre de qualquer luz exterior, e mantidas sob a iluminação da caixa por 15 minutos. Concomitantemente, a mesma solução foi mantida no escuro em tubos de ensaio encapados com papel alumínio, consistindo no branco de cada amostra. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas através de agitação em vortex. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em  $\text{U SOD mg proteína}^{-1}$ .

#### **4.4.6.10 Catalase (CAT, 1.11.1.6)**

A atividade da catalase foi determinada monitorando-se a degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  segundo metodologia de Azevedo et al. (1998). Em 25  $\mu\text{L}$  do extrato proteico foi adicionado 1 mL da solução tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 2,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Imediatamente após as amostra foram agitadas em vortex. A determinação, da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi efetuada em intervalos de 2 min à 25 °C em espectrofotômetro a 240 nm e os resultados expressos em  $\text{nmol mg proteína}^{-1}$ .

#### **4.4.6.11 Peroxidase (EC. 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada segundo (LIMA, 1994). Em 150  $\mu\text{L}$  do extrato proteico foram adicionadas as soluções tampão fosfato pH 6,7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), amino-antiperina e fenol, com posterior incubação em banho-maria a 30 °C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de álcool etílico e as amostras foram agitadas em vortex. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os conjuntos de dados considerados, foi analisada a normalidade dos dados, utilizando-se o teste de Anderson-Darling e verificando-se a homocedasticidade dos dados com o teste da equação da variância (ou teste de Levenn's). Os dados foram submetidos à análise de variância, com níveis de significância de 0,05 de probabilidade, pelo teste F. Quando significativas, as médias foram submetidas ao teste Tukey em nível de 0,05 de probabilidade utilizando-se o programa estatístico Minitab e Sigmaplot.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

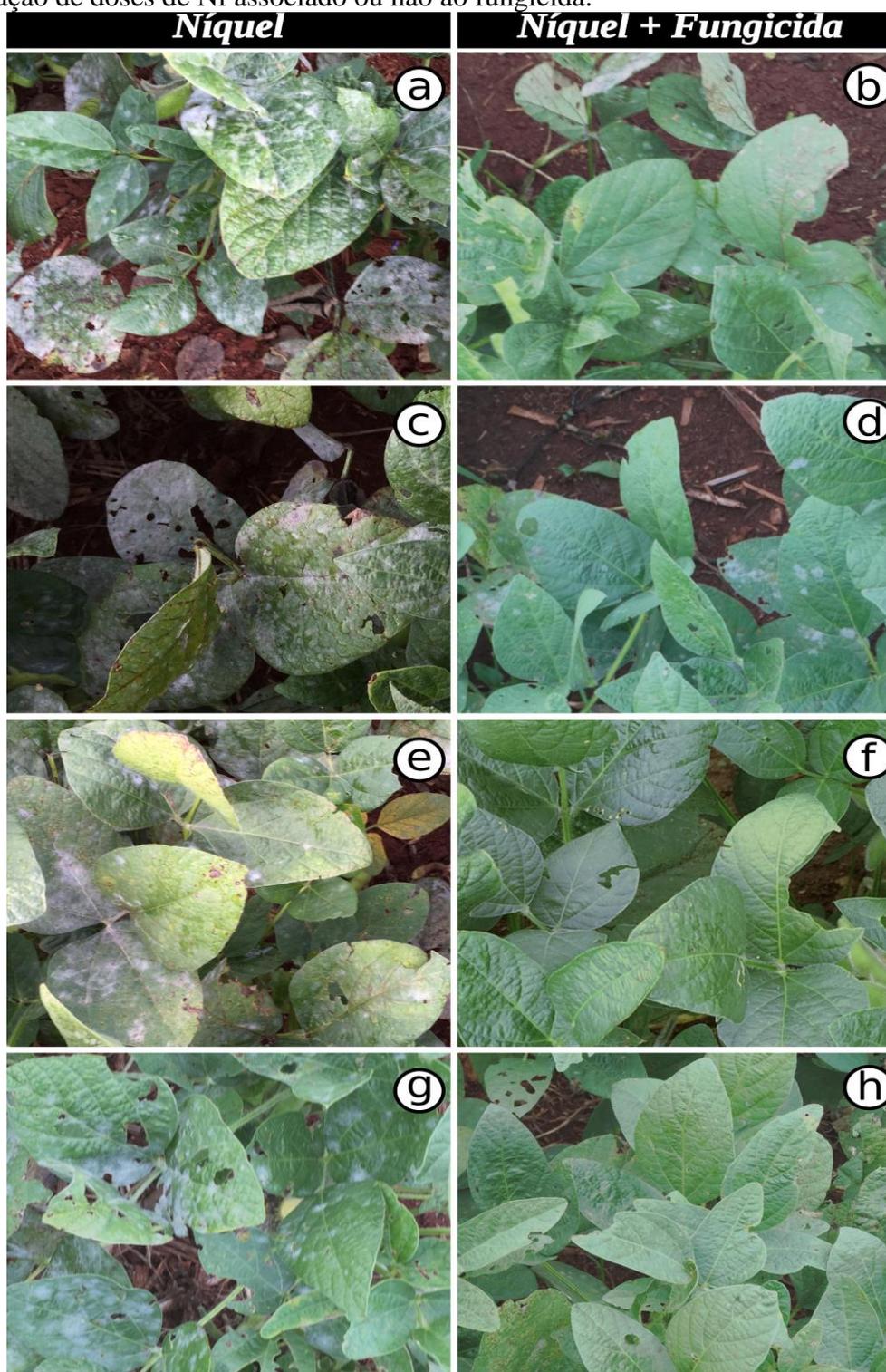
### 5.1 EFEITO DO NI NA SEVERIDADE DO OÍDIO

O controle do fungo *Erysiphe diffusa*, agente causal do oídio na soja, vem sendo realizado com aplicação de fungicidas, principalmente dos grupos químicos estrobilurina e carboxamida que atuam sobre a respiração mitocondrial do fungo. As estrobilurinas agem inibindo o transporte de elétrons no complexo 3 mitocondrial, portanto, inibindo a respiração dos fungos e, conseqüentemente, a formação de ATP. Enquanto as carboxamidas atuam no complexo 2 da cadeia de transporte de elétrons, chamado de complexo succinato-desidrogenase, resultando no bloqueio da produção de ATP e na formação de moléculas intermediárias prejudiciais à célula (YORINORI et al., 2004; ATTANAYAKE et al., 2010).

Na Figura 2 observa-se a influência do Ni nas estruturas reprodutivas – conídios – e hifas fúngicas. Os tratamentos com menor incidência de oídio, ou seja, associados a aplicação de Ni com e sem o fungicida, não apresentaram o desenvolvimento dessas estruturas ou elas se apresentaram danificadas. Pode-se observar também, que mesmo nas maiores doses de Ni, não ocorreu efeito tóxico desse micronutriente nas folhas, uma vez que não observou-se alterações anatômicas na superfície foliar.

A aplicação foliar de Ni associado ao fungicida reduziu drasticamente a severidade do fungo nas plantas de soja como ilustrado nas Figuras 3 e 4. O Ni, a partir da dose de 40 g ha<sup>-1</sup>, associado ou não ao fungicida proporcionou menor incidência da doença. Esse micronutriente, quando associado ao fungicida, proporcionou melhor controle do oídio em relação a sua aplicação isolada. Quando aplicado isoladamente, o Ni foi mais efetivo no controle da doença nas doses 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>.

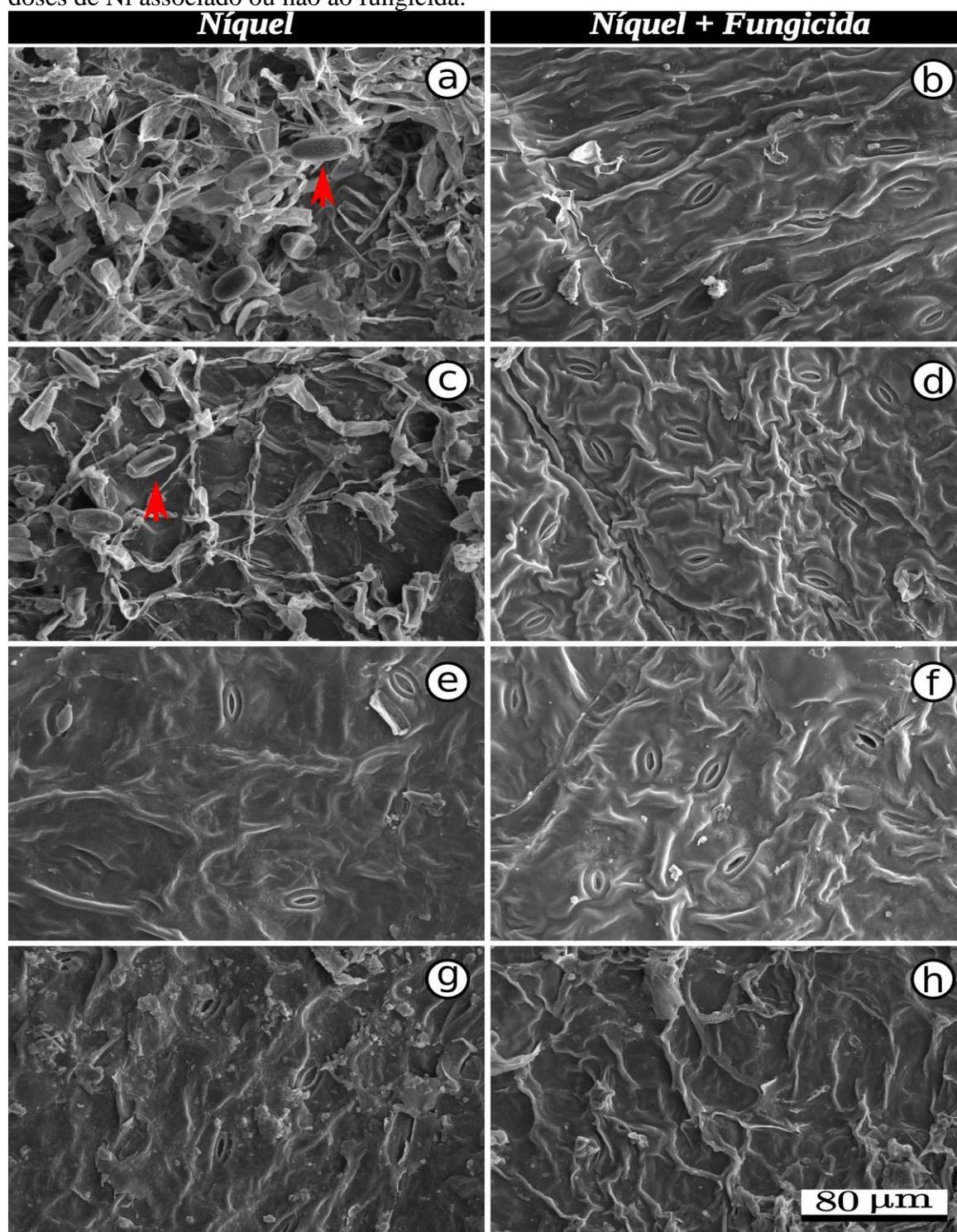
**Figura 2-** Diagnóstico visual da severidade de incidência do oídio da soja em resposta a aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: (a) T1 – controle (sem aplicação de Ni e fungicida); (b) T8 – (somente aplicação do fungicida (Fluxapiraxade + Piraclostrobrina) 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>); (c) T2 – aplicação de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (d) T9 – aplicação de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>; (e) T5 - aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (f) T12 - aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>; (g) T7 - aplicação de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (h) T14 - aplicação de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>.

Fonte: elaboração do próprio autor.

**Figura 3-** Eletromicrografia da conídias e hifa do oídio da soja em resposta a aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: (a) T1 – controle (sem aplicação de Ni e fungicida); (b) T8 – (somente aplicação do fungicida (Fluxapiroxade + Piraclostrobrina) 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>); (c) T2 – aplicação de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (d) T9 – aplicação de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>; (e) T5 - aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (f) T12 - aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>; (g) T7 - aplicação de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni; (h) T14 - aplicação de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni + fungicida 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>. Setas em vermelho indicam detalhes da hifa e da conídias do fungo *Erysiphe diffusa*.  
Fonte: elaboração do próprio autor.

Os tratamento 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado a 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do fungicida diminuiu 99% da severidade do fungo como ilustrado na Figura 3-F, deixando as folhas com verde intenso e ausência total de hifas e conídias do fungo (Figura 2-F). Na Figura 2 observa-se a influência do Ni nas estruturas reprodutivas – conídios – e hifas fúngicas. Na testemunha Figura 2-A a seta vermelha indica a estrutura da conídia do fungo e a seta vermelha na Figura 2-C indica estrutura de hifa e conídia danificada pelo tratamento foliar de Ni. Pelas Figuras 2 e 3 fica claro o efeito sinérgico antifúngico da aplicação do Ni associado ou não ao fungicida na redução da severidade do oídio.

Além disso, observa-se pelas imagens de eletromicrografias (Figuras 2-A a 2-H) que as doses de Ni aplicado associado ou não ao fungicida não provocaram toxidez de Ni na folha e nem alterações ultraestruturais. De acordo com a Figura 4, observa-se que aplicação a partir de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado a 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do fungicida diminuiu significativamente a severidade do fungo na soja. Para doses acima desse valor não houve diferença estatística significativa. Pela análise de correlação de Pearson, a porcentagem de severidade de oídio teve correlação negativa ao nível de 1 % de significância com o teor foliar de Ni ( $r = -0,394$ ), com o teor de ferro nos grãos ( $r = -0,392$ ), e com o teor de Ni nos grãos ( $r = -0,431$ ) como observado na Tabela 1.

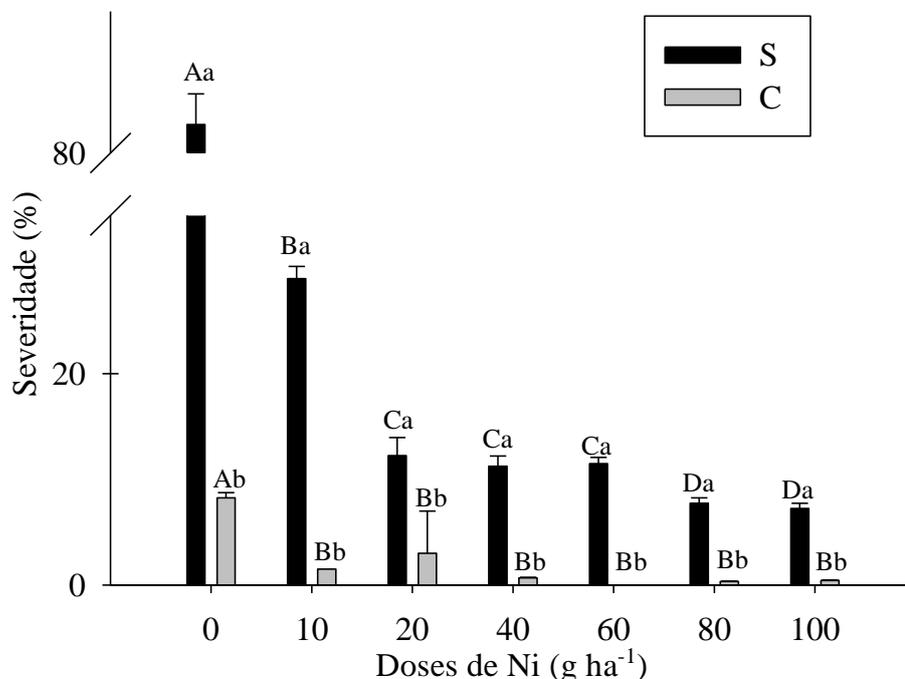
Entretanto, Graham, Welch e Walker (1985), aplicando Ni via solo, também observaram redução do número de lesões necróticas, causadas por *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. Em feijão-caupi foi demonstrado que o Ni causa mudanças fisiológicas como aumento da atividade da urease que levam a redução nos danos causados por patógenos (GERENDÁS et al., 1999). Comparando a aplicação via solo e via foliar de Ni, Queiroz (2012) observou menores valores de severidade de ferrugem asiática na soja para doses até 60 g ha<sup>-1</sup>, independente da forma de aplicação, obtendo para esta dose severidade semelhante a de 2 aplicações de fungicida. Porém Queiroz (2012) não avaliou nenhum metabólito para explicar fisiologicamente os resultados observados.

## 5.2 ATIVIDADE DA UREASE E CONCENTRAÇÃO DE UREIA

No presente estudo, o fungicida utilizado sem a combinação de doses de Ni (controle) não aumentou a atividade da urease (Figura 5-A). Houve efeito sinérgico da aplicação do fungicida associado ao Ni nas doses entre 10 a 40 g ha<sup>-1</sup> na atividade da urease. Doses até 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ou não ao fungicida aumentaram a atividade da urease, porém doses acima de 60 g ha<sup>-1</sup> diminuíram a atividade enzimática principalmente quando associada ao

fungicida. Porém essas atividade ainda foram superiores quando comparadas às testemunhas sem Ni (Figura 5-A).

**Figura 4-** Porcentagem de severidade de incidência do oídio nos trifólios da soja em função da aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida.

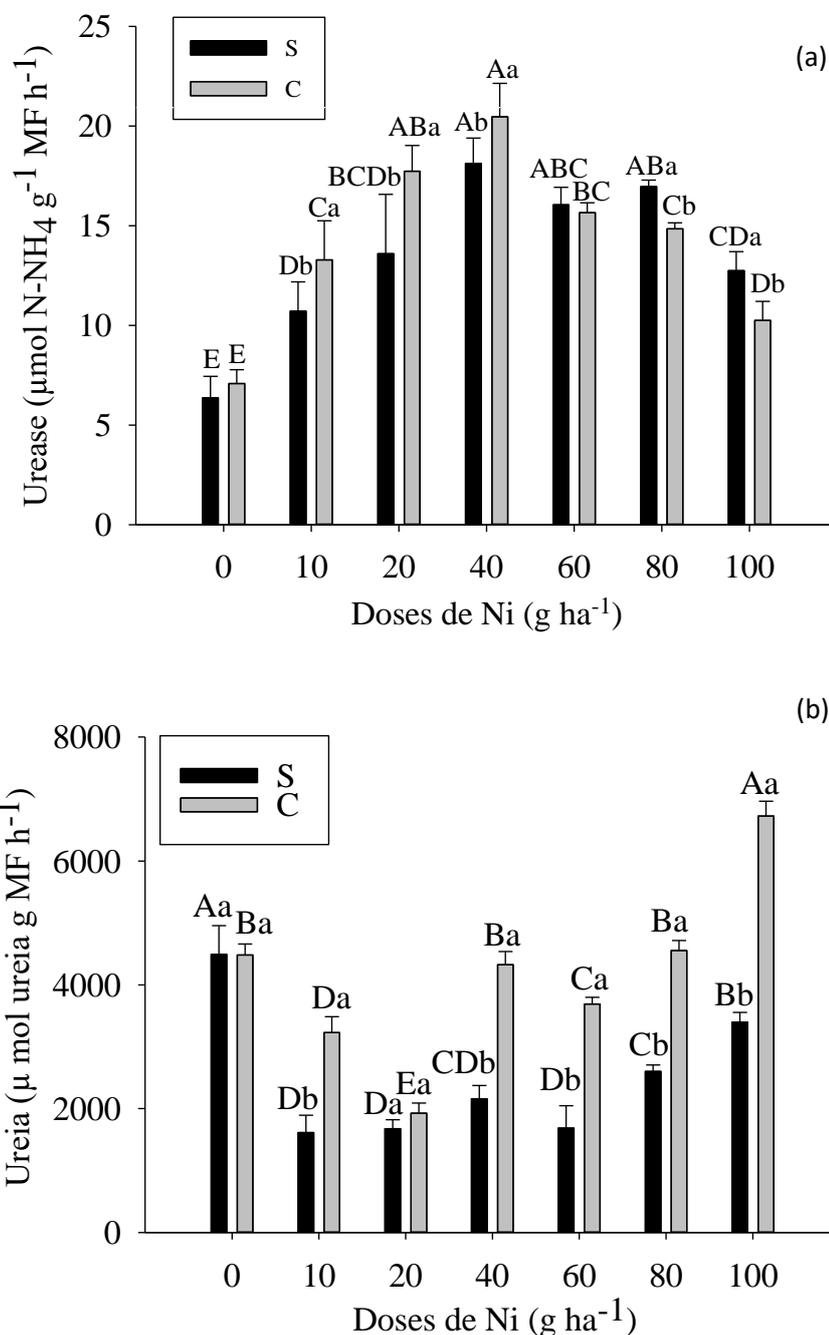


Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

A atividade da urease teve correlação positiva com o teor de proteína ( $r = 0,330$ ), atividade das enzimas antioxidantes SOD ( $r = 0,711$ ), CAT ( $r = 0,574$ ), POD ( $r = 0,566$ ), teor de Ni nas folhas ( $r = 0,290$ ) como observado na Tabela 1. Além disso, teve correlação negativa com a porcentagem de severidade de oídio ( $r = -0,475$ ), indicando ser uma enzima chave no mecanismo fisiológico para tolerância ao oídio, bem como com o conteúdo de ureia ( $r = -0,421$ ), isso porque a urease é a enzima responsável pela catalise da hidrólise da ureia em amônia e gás carbônico, logo o aumento na atividade enzimática da urease vem acompanhado da redução no conteúdo de ureia.

**Figura 5** - Atividade da urease (a) e concentração de ureia (b) no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

Indiretamente o Ni afeta os microrganismos pela atividade da urease, esta enzima em algumas bactérias e plantas, apresenta efeito antifúngico (CARLINI; LIGABUE-BRAUN,

2016). Recentemente, Wiebek-Strhom et al. (2012) estudando soja transgênica com supressão do gene da urease, observaram que *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp. e *Penicillium hergueli* apresentaram maior incidência quando a atividade da urease era baixa. Observaram também lesões foliares mais evidentes de *Phakopsora pachyrhizi* no genótipo com gene de supressão. Esses resultados corroboram com a correlação obtida nesse estudo entre a atividade da enzima urease e a severidade do oídio.

A atividade da urease aumenta com a aplicação de Ni como observado por Eskew, Welch e Norvell (1984), Klucas et al. (1983) e Krogmeier et al. (1991), cultivando soja em solução nutritiva contendo Ni na concentração de 0,001 a 0,1 mg L<sup>-1</sup>, corroborando com a correlação positiva entre o Ni foliar e a atividade da urease obtida no presente trabalho. O aumento da atividade enzimática também foi verificado em outras culturas como cereais (BROWN; WELCH; CARY, 1987), cucurbitáceas (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1997), arroz (GERENDÁS; ZHU; SATTELMACHER, 1998), e pecã (*Carya illinoensis*) (BAI; REILLY; WOOD, 2006), tomate (GAD; EL-SHERIF; EL-GEREEDLY, 2007) e alface (OLIVEIRA et al., 2013).

Como o Ni faz parte do grupo prostético da urease (DIXON et al., 1975), seu fornecimento aumenta a atividade da urease, porém em altas concentrações sua atividade diminui, evidenciando o efeito tóxico, como verificado por Rodak (2014), que obteve pico de atividade da urease para as doses 0,5 e 0,6 mg dm<sup>-3</sup> de Ni, seguida de queda para as doses maiores de Ni. Esses resultados corroboram com o presente trabalho, que aplicações foliares de Ni acima de 60 g ha<sup>-1</sup> associada ou não ao fungicida diminuiu a atividade da urease nas folhas.

Foi observado ainda que a aplicação Ni combinado com o fungicida teve efeito sinérgico sobre a atividade da urease até a dose 40 g ha<sup>-1</sup>, produzindo efeito antagônico a partir da aplicação de 60 g ha<sup>-1</sup>. Estudos com cotilédones de abobrinha (El SHORA; ALI, 2016), verificaram incremento na atividade da enzima urease com a aplicação de 10 a 60 mg L<sup>-1</sup> de triazol, contendo triadimefon ou hexaconazole no tratamento de sementes.

A concentração de ureia na soja diminuiu com as aplicações de Ni via foliar (Figura 5-B). Em condições de baixa concentração de Ni no tecido foliar há acúmulo de ureia nos tecidos (SHIMADA; ANDO, 1980; ESKEW; WELCH; NORVELL 1983; ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984) efeitos similares também foram observados em plantas de tomate (SHIMADA; ANDO, 1980), e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (WALKER et al., 1985). Foi demonstrado que a adição de Ni a solução nutritiva alivia sintomas de toxicidade causado pelo acúmulo de ureia (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1997; GERENDÁS;

ZHU; SATTELMACHER, 1998; TAN; IKEDA; ODA, 2000; ARKOUN et al., 2013), o mesmo ocorre através da aplicação foliar de Ni (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013).

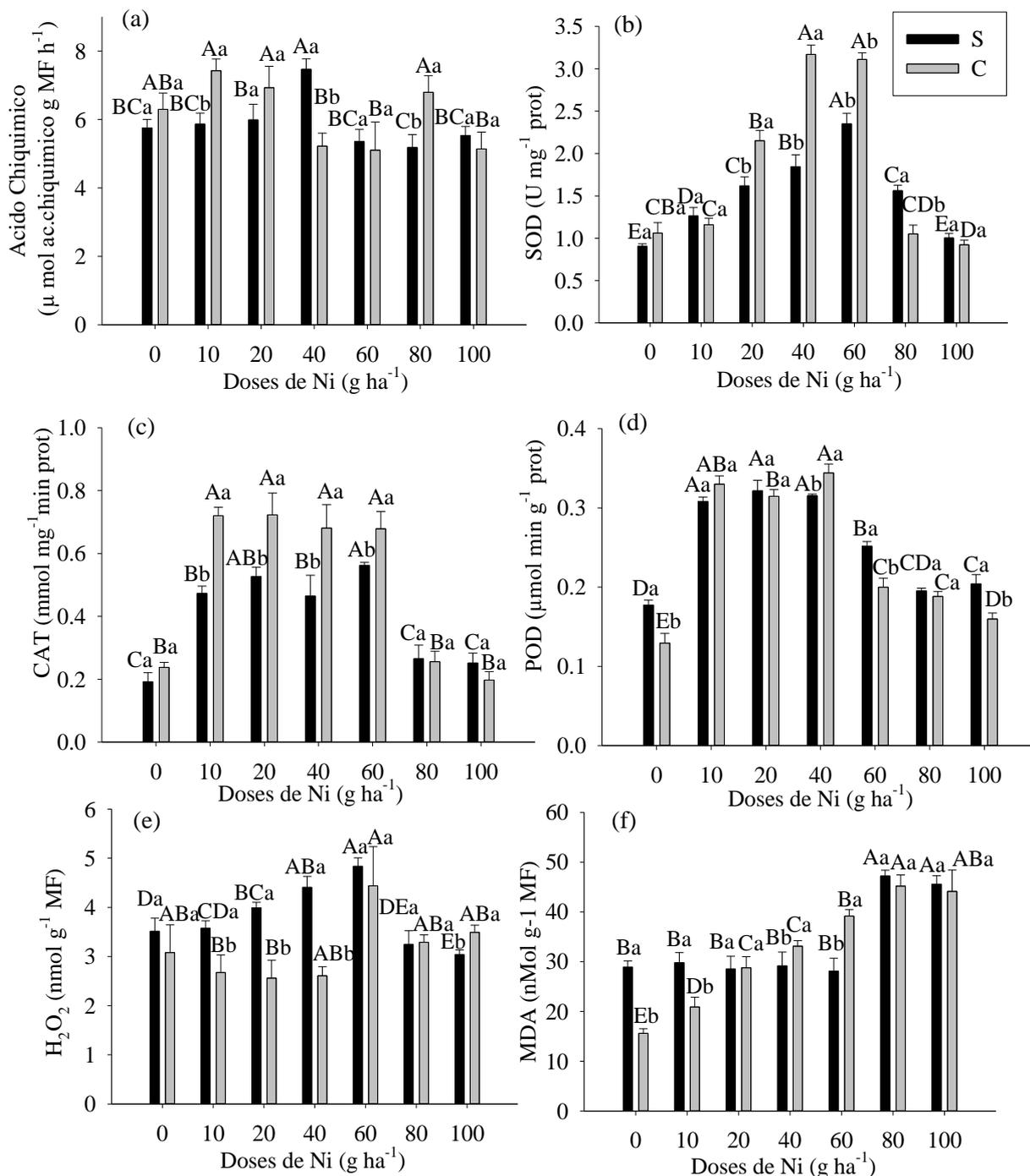
Nesse estudo, o fungicida utilizado sem a combinação de doses de Ni (controle) não reduziu o conteúdo de ureia (Figura 5-B). Para os tratamentos sem o fungicida houve redução no conteúdo de ureia a partir da dose de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni, seguido de aumento no conteúdo a partir da dose de 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni, acompanhando a atividade da enzima urease. Entretanto, apesar dos tratamentos com fungicida apresentarem efeito sinérgico com as doses de Ni para a atividade da urease, o conteúdo de ureia apresentado foi superior àquele apresentado para os tratamento sem fungicida, sendo que para a dose de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ao fungicida, o conteúdo de ureia foi superior ao conteúdo apresentado pela testemunha sem Ni, demonstrando que o efeito do fungicida quando associado as doses de Ni, apesar de contribuir com o aumento na atividade da enzima urease, não contribuíram para a redução no concentração de ureia.

### 5.3 TEOR PROTEICO E ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS

A aplicação foliar de Ni sem associação com fungicida apresentou maior concentração de ácido chiquímico para a dose 40 g ha<sup>-1</sup>, e menor concentração para a dose 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni, não diferindo estatisticamente para as demais doses (Figura 6-A). No entanto, para os tratamentos com fungicida as doses 10, 20 e 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni apresentaram maiores concentrações de ácido chiquímico, enquanto que as doses 40, 60 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni apresentaram as menores concentrações, sendo que não houve diferença estatística para o tratamento sem Ni.

A atividade da SOD aumentou linearmente até a dose 60 g ha<sup>-1</sup> independentemente da combinação ou não com o fungicida (Figura 6-B). Porém as mesmas doses de Ni associadas ao fungicida foram significativamente maiores em relação a aplicação do Ni de forma isolada.

**Figura 6-** Concentração de ácido chiquímico e atividade de enzimas antioxidativas no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: (a) concentração de ácido chiquímico; (b) atividade da superóxido dismutase; (c) atividade da catalase, (d) atividade da peroxidase; (e) peroxidação lipídica e (f) concentração de peróxido de hidrogênio. Abreviações: S – sem aplicação do fungicida, C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

Doses acima de 60 g ha<sup>-1</sup> combinadas ou não com o fungicida promoveu uma queda drástica na atividade da SOD. Isso sugere que aplicações foliares de doses acima de 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni na soja pode comprometer a atividade da SOD e favorece a formação de espécies reativas de oxigênio. Tal fato foi observado na dose de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni aumentou significativamente a concentração de malondialdeído (MDA), o que representa o aumento na peroxidação lipídica no tecido foliar (Figura 6-F)

A atividade da CAT e POD tiveram resultados similares em função da aplicação foliar de Ni (Figuras 6-C e 6-D). A aplicação foliar de Ni entre as doses 10 a 60 g ha<sup>-1</sup> aumentou a atividade da CAT e esses valores foram muito maiores da presença do fungicida. Aparentemente há um efeito sinérgico da aplicação foliar do fungicida e o Ni nas doses entre 10 a 60 g ha<sup>-1</sup>. O aumento de enzimas antioxidativas como a CAT é um processo fundamental para evitar formação de radicais livres na planta bem como aumentar a resistência contra fatores bióticos e abióticos. Já a POD (Figura 6-D) teve aumento significativo entre as doses 10 a 40 g ha<sup>-1</sup>, porém sem o efeito significativo da combinação do fungicida com o Ni.

O Ni é elicitador do metabolismo antioxidante da planta ajudando no estresse biótico e abiótico (REIS et al., 2014), dessa forma contribuindo na defesa da planta (THAKUR; SOHAL, 2013). Espécies reativas de oxigênio são comumente produzidos, porém essa produção é aumentada sob condições de estresse, dessa forma a ativação de mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, é importante para a manutenção do estado fisiológico da planta (THAKUR; SOHAL, 2013). Alguns dos metabólitos produzidos pelas plantas para aliviar danos celulares e eliminar espécies reativas de oxigênio, têm origem na rota do ácido chiquímico como flavonoides, antocianinas e fenóis (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016), como observado pela correlação entre o ácido chiquímico e a peroxidação lipídica.

A aplicação de fungicida reduziu a concentração de peróxido de hidrogênio quando associado as doses 10, 20 e 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni, apresentando efeito positivo já que a aplicação das mesmas doses de Ni sem o fungicida apresentaram aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 6-E), com exceção para a dose 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni que na presença de fungicida apresentou maior concentração. Para as demais doses o efeito na concentração de peróxido de hidrogênio é decorrente das doses de Ni, não havendo diferença para a aplicação de fungicida.

A aplicação de doses de Ni sem o fungicida até a dose 60 g ha<sup>-1</sup> não apresentou diferença estatística do controle sem o Ni para a concentração de MDA foliar (Figura 6-F). Entretanto, a aplicação de fungicida associado às doses 0 e 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni reduziu a

concentração de MDA, e aumentou quando associado às doses 40 e 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni. Por outro lado, o aumento na concentração de MDA observado para as doses 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni, são influenciados apenas pelas doses de Ni.

Em relação as enzimas antioxidativas, a atividade da SOD teve correlação positiva a atividade da CAT ( $r = 0,717$ ), POD ( $r = 0,416$ ), com a concentração de peróxido de hidrogênio ( $r = 0,310$ ), e com o teor de Fe nos grãos ( $r = 0,267$ ). Interessante notar que a SOD teve uma correlação negativa com a porcentagem de severidade de oídio ( $r = -0,334$ ), teores foliares de manganês ( $r = -0,419$ ) e zinco ( $r = -0,382$ ). No caso dos grãos a correlação negativa foram com os nutrientes nitrogênio ( $r = -0,381$ ) e potássio ( $r = -0,330$ ). Por outro lado, a atividade da CAT teve correlação positiva com a atividade da POD ( $r = 0,761$ ), teor foliar de ferro ( $r = 0,365$ ) e teor de ferro nos grãos ( $r = 0,4$ ). A CAT teve correlação negativa com a concentração de MDA ( $r = -0,348$ ), e, similar a SOD, a CAT também teve uma correlação negativa a porcentagem de severidade de oídio ( $r = -0,353$ ), teor foliar de zinco ( $r = -0,347$ ), teor foliar de Ni ( $r = -0,374$ ), teor de nitrogênio nos grãos ( $r = -0,316$ ), e teor de Ni nos grãos ( $r = -0,349$ ). A atividade da POD teve correlação positiva com o teor foliar de Fe ( $r = 0,359$ ), e com o teor de Zn nos grãos ( $r = 0,401$ ), e correlação negativa com a concentração de MDA ( $r = -0,313$ ), com o teor foliar de Ni ( $r = -0,404$ ) e com o teor de Ni nos grãos ( $r = -0,359$ ). Interessante notar que, a POD não teve correlação negativa com a porcentagem de severidade do oídio, o que indica que a urease, SOD e CAT são as principais enzimas envolvidas na regulação fisiológica da diminuição da severidade da doença em função da aplicação foliar de Ni.

A concentração de MDA teve correlação positiva com o teor foliar de Cu ( $r = 0,321$ ), com o teor foliar de Ni ( $r = 0,827$ ), e com o teor de Ni nos grãos ( $r = 0,875$ ), e correlação negativa com a concentração de ácido chiquímico ( $r = -0,420$ ), com os teores foliares de Fe ( $r = -0,489$ ) e Mn ( $r = -0,330$ ), e com o teor de Zn nos grãos ( $r = -0,257$ ). Enquanto que a concentração de peróxido de hidrogênio teve correlação negativa com os teores foliares de Fe ( $r = -0,323$ ) e Zn ( $r = -0,226$ ).

As respostas enzimas em função da fertilização com Ni pode variar entre as espécies. Já foram verificadas, que baixas doses de Ni (< 200 µM) promovem aumentos na atividade de SOD, CAT e POD em milho (BACCOUCH; ABDELILAH; EZZEDDINE, 2001), arroz (MAHESHWARI; DUBEY, 2009) e aguapé (GONZÁLEZ et al., 2015). Entretanto, a dose de 200 µM, reduziu a atividade de SOD e CAT, e aumentou a atividade de POD em brotos de trigo (GAJEWSKA et al., 2006). Aplicado na dose de 0,5 mM, o Ni aumentou a atividade de SOD, CAT e POD em células de cafeeiro (GOMES JUNIOR et al., 2006), e de SOD e POD

em mudas de cajú (RAO; SRESTY, 2000). Todavia levou a queda na atividade de CAT em cajú (RAO; SRESTY, 2000) e canola (KAZEMI et al., 2010) e de CAT e POD em folhas de repolho (PANDEY; SHARMA, 2002).

Em plantas de soja Sirhindi et al. (2015), verificou aumento na atividade de SOD e CAT, e redução na atividade de POD aplicando 2 mM de cloreto de Ni, por sua vez, a produção de  $H_2O_2$  foi aumentada em 36% quando comparado ao controle sem Ni, levando a um aumento de 87% na concentração de MDA. No presente trabalho, para as doses semelhantes a concentração utilizada por Sirhindi et al. (2015) foi verificado aumento de SOD, CAT e POD, que só tiveram sua atividade reduzida em doses acima de  $60\text{ g ha}^{-1}$ .

A aplicação de doses de Ni acima de  $60\text{ g ha}^{-1}$  levaram a um aumento concentração de MDA, enquanto que a dose de  $60\text{ g ha}^{-1}$  de Ni apresentou a concentração de  $H_2O_2$ . Foi demonstrado que concentrações excessivas de Ni aumentam a concentração de  $H_2O_2$  em (BOOMINATHAN; DORAN, 2002), e de peroxidação da membrana lipídica em várias espécies como milho, trigo, feijão guandú, soja e plantas do gênero *Alyssum* (PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992; BACCOUCH; CHAOUI; FERJANI, 1998; RAO; SRESTY, 2000; BOOMINATHAN; DORAN, 2002; HAO; WANG; CHEN, 2006; STEBBINS; POLACCO, 1995; KAZEMI et al., 2010)

Apesar do incremento exercido pelo Ni sobre a atividade das enzimas antioxidantes, o teor de Ni na folha apresentou correlação negativa para CAT e POD (Tabela 1). Por sua vez, a atividade da enzima urease apresentou correlação positiva para as três enzimas, indicando uma influência indireta do Ni sobre a atividade dessas enzimas. De forma semelhante ao verificado para a urease, a aplicação de fungicida também teve efeito sinérgico sobre a atividade das enzimas antioxidantes até a dose de  $60\text{ g ha}^{-1}$  para SOD e CAT, e até a dose  $40\text{ g ha}^{-1}$  em POD.

A SOD atua na primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio, sendo responsável por dismutar o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em formas menos tóxicas  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Em seguida CAT e POD são responsáveis por transformar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (THAKUR; SOHAL, 2013). Isso explica a correlação entre a SOD e o conteúdo de  $H_2O_2$ , e com CAT e POD.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

A aplicação foliar de Ni alterou o concentração foliar de nitrogênio total nas plantas de soja, contudo, sem apresentar um comportamento em relação aos tratamentos (Figura 7-A), enquanto, para o fungicida não houve efeito. Entre os demais nutrientes, destaca-se o

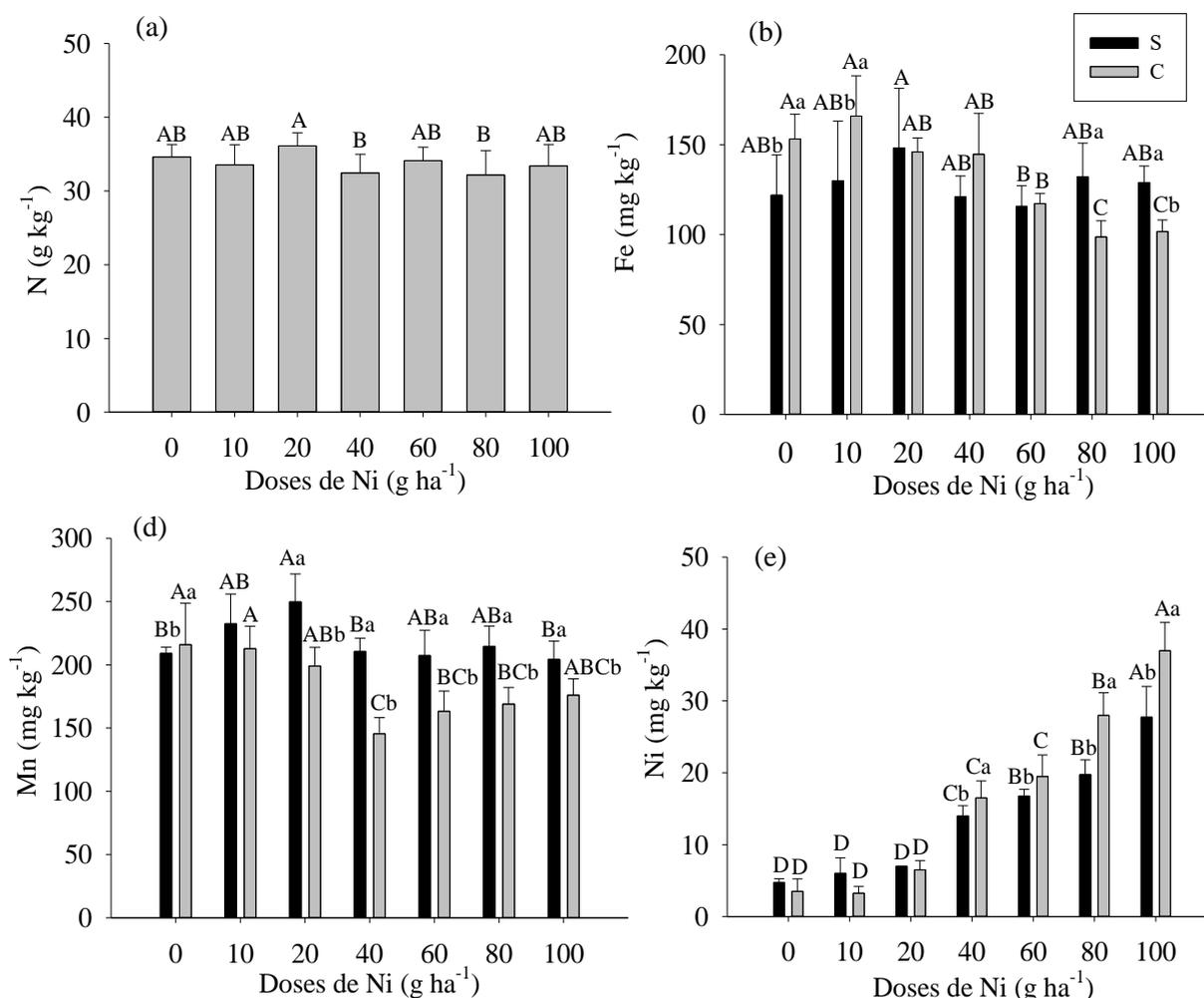
comportamento do ferro e manganês que apresentaram menores concentrações associados as maiores doses de Ni, com ou sem fungicida (Figuras 7-B e 7-C). Em relação ao manganês e ferro nos grãos de soja foi variável em função das aplicações de Ni associado ou não ao fungicida, a concentração de manganês não diferiu estatisticamente até a dose de 80 g ha<sup>-1</sup>. Similar como ocorrido no tecido foliar, a dose de 20 g ha<sup>-1</sup> proporcionou levemente maiores teores de manganês no grão (Figuras 8-A e 8-B).

Apesar de ser constituinte da urease, enzima responsável pela quebra do ureia em amônio e gás carbônico (DIXON et al., 1975) e portanto ser responsável pela reciclagem do nitrogênio na planta (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015), tanto o Ni quanto a urease não apresentaram correlação significativa com o teor de nitrogênio nas folhas ou nos grãos. Esse resultado corrobora com alguns trabalhos realizados em soja (RODAK, 2014); colza (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1999) e alface (OLIVEIRA et al., 2013), que também não verificaram alteração no teor de nitrogênio no tecido foliar pela aplicação de Ni. Entretanto, houve diferença significativa para teor de nitrogênio em plantas tratadas com fungicida, sob influência das doses de Ni, apesar desse efeito ser quase constante, sendo que apenas a dose 20 g ha<sup>-1</sup> foi superior às demais estatisticamente.

Quanto a interação com os demais nutrientes, de maneira geral, absorção de macro e micronutrientes catiônicos é reduzida em altas concentrações de Ni nos órgãos das plantas (BARSUKOVA; GAMZIKOVA, 1999), isso ocorre porque o Ni utiliza transportadores não específicos de cátions, como YSL, ZIP/Nramp e nicotianamina sintase, dessa forma, causando competição entre os cátions divalentes, com destaque para Cu, Fe, Mn e Zn (DOUCHKOV et al., 2005; MIZUNO et al., 2005; GENDRE et al., 2006).

Dessa forma, é relatado na literatura uma redução na absorção de ferro por plantas fertilizadas com Ni (RAHMAN et al., 2005). De maneira que o excesso de Ni causa sintomas de clorose nas folhas, semelhantes aos sintomas de deficiência de ferro nas plantas (MISHRA; KAR, 1974). Buscando elucidar o mecanismo subjacente de fitotoxicidade de Ni, Nishida et al. (2015), demonstraram que o Ni além de utilizar os transportadores de ferro, IRT1 (Iron-regulated transporter 1), que é homólogo aos transportadores da família ZIP, ainda estimulam sua expressão, acelerando ainda mais o acúmulo de Ni no tecido foliar.

**Figura 7** - Teores foliares de nitrogênio e micronutrientes na soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



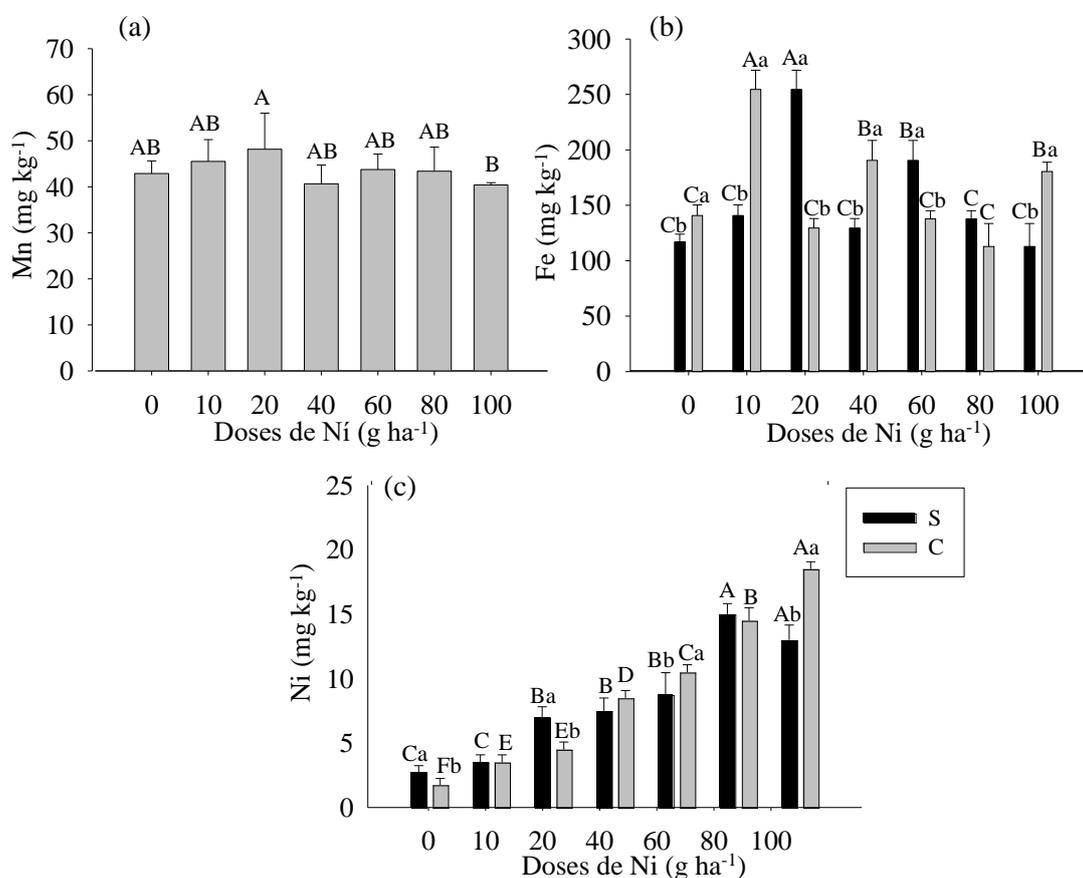
Legenda: S – sem fungicida, C – com fungicida. (a) nitrogênio; (b) ferro; (c) manganês; (d) níquel. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não são significativamente diferentes e acordo com teste t ( $p \leq 0,05$ ) na sequência de uma comparação horizontal de barras a partir de diferentes doses de Ni. As barras de erro representam o erro padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

Além disso, segundo Kazemi et al. (2010), algumas enzimas antioxidantes como a CAT e a POD contém ferro em sua estrutura. Justificando, dessa forma, a correlação positiva entre o conteúdo foliar de ferro, CAT e POD. Devido as altas concentrações de Ni diminuir o conteúdo de ferro no tecido vegetal (PANDEY; SHARMA, 2002), a redução da atividade dessas enzimas é decorrente da falta de ferro para sua biossíntese (KAZEMI et al., 2010), o que pode estar relacionado a correlação negativa apresentada pelo teor de Ni na folha e a atividade dessas duas enzimas, bem como com o conteúdo de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que são controlados por essas enzimas.

De acordo com a correlação de Pearson, o teor foliar de nitrogênio apresentou correlação positiva com o teor foliar de ferro ( $r = 0,362$ ) e correlação negativa com o teor foliar de Ni ( $r = -0,323$ ) como observado na Tabela 1. Já os teores foliares de fósforo teve correlação positiva com os teores foliares de cálcio ( $r = 0,489$ ), cobre ( $r = 0,297$ ), zinco ( $r = 0,452$ ), e teor de enxofre nos grãos ( $r = 0,306$ ). O teor foliar de ferro correlacionou-se positivamente com o teor de manganês nos grãos ( $r = 0,295$ ) e negativamente com o teor de Ni na folha ( $r = -0,567$ ) e Ni nos grãos ( $r = -0,489$ ). Essa relação negativa entre ferro e Ni é devido a ocupação do mesmo sítio ativo e proteínas transportadoras de cátions divalentes.

**Figura 8** - Teores de nutrientes em grãos de soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem fungicida, C – com fungicida. (a) manganês; (b) ferro; (c) níquel. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não são significativamente diferentes e acordo com teste t ( $p \leq 0,05$ ) na sequência de uma comparação horizontal de barras a partir de diferentes doses de Ni. As barras de erro representam o erro padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

O conteúdo foliar de Ni variou de 3.8 a 38.0 mg kg<sup>-1</sup> aumenta em função da sua aplicação foliar independente da aplicação de fungicida (Figura 7-D). O Ni, quando aplicado com o fungicida, apresentou a partir da dose de 40 g ha<sup>-1</sup> maiores valores, evidenciando um

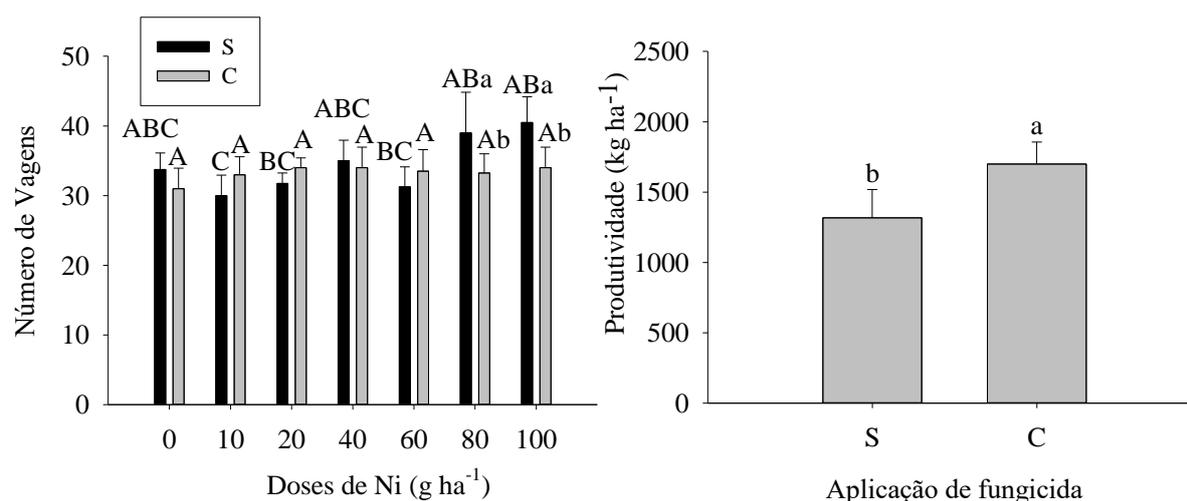
efeito sinérgico com o fungicida. O conteúdo de Ni no grão variou de 3 a 18 mg kg<sup>-1</sup> de Ni, apresentou comportamento semelhante ao conteúdo foliar, dessa forma, evidenciando elevada taxa de translocação. O teor foliar de Ni teve correlação negativa com os teores de cobre ( $r = -0,318$ ), manganês ( $r = -0,322$ ), e zinco ( $r = -0,255$ ) nos grãos, e correlação positiva com o teor de Ni ( $r = 0,935$ ).

Em relação os nutrientes no grão em função das aplicações de Ni associado ou não ao fungicida, os teores de manganês não diferiu estatisticamente até a dose de 80 g ha<sup>-1</sup>. Similar como ocorrido no tecido foliar, a dose de 20 g ha<sup>-1</sup> proporcionou maiores teores de manganês no grão (Figura 8-A). Os teores de Ni no grão aumentaram linearmente com a aplicação foliar de Ni, o que indica grande translocação do elemento (Figura 8-C).

### 5.5 PARAMETROS DE PRODUTIVIDADE

O número de vagens da soja é uma variável agrônômica importante e pode refletir na produtividade. A aplicação de doses de Ni entre 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> aumentou o número de vagens em relação ao controle, porém não aumentou significativamente a produtividade. Por outro lado, a aplicação do fungicida aumentou a produtividade da soja em aproximadamente 200 kg por hectare.

**Figura 9-** Número de vagens e produtividade da soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem fungicida, C – com fungicida. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não são significativamente diferentes e acordo com teste t ( $p \leq 0,05$ ) na sequência de uma comparação horizontal de barras a partir de diferentes doses de Ni. As barras de erro representam o erro padrão da média ( $n = 4$ ).

Fonte: elaboração do próprio autor.

O número de vagens apresentou correlação positiva com o teor de Ni nas folhas e nos grãos, porém o efeito dos tratamentos não foi regular. Rodak (2014), trabalhando com a aplicação de doses de Ni na cultura da soja em condições de casa de vegetação não observou efeito significativo dos tratamentos sobre o número de vagens.

A produtividade aumentou em função do fungicida, o qual proporcionou menor severidade de oídio. Nesse estudo, apesar da melhoria fisiológica, nutricional e menor incidência de oídio possibilitada pelo Ni, esse micronutriente não proporcionou incrementos na produção. A produtividade apresentou correlação positiva com o teor de Ni nas folhas, apesar disso não houve efeito significativo das doses de Ni como relatado em diversos trabalhos com a aplicação de Ni em soja (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; RODAK, 2014). A correlação positiva pode ser resultado indireto do efeito do Ni sobre a severidade do oídio, corroborando dados da literatura (REIS et al., 2014). Esses autores atribuíram a ação do Ni sobre o controle de doenças fúngicas como a ferrugem asiática sobre o aumento de produtividade da soja com a aplicação de 50 g ha<sup>-1</sup> de Ni.

O número de vagens teve correlação positiva ao nível de 1 % de significância com o teor de proteína solúvel ( $r = 0,338$ ), cobre ( $r = 0,327$ ) e Ni ( $r = 0,359$ ) nas folhas e com os teores de boro ( $r = 0,367$ ) e Ni ( $r = 0,37$ ) nos grãos. Já a produtividade teve correlação negativa com o índice SPAD ( $r = -0,321$ ), com a porcentagem de severidade do oídio ( $r = -0,5$ ), nitrogênio ( $r = -0,351$ ), boro ( $r = -0,371$ ), manganês ( $r = -0,540$ ) e relação positiva com o Ni ( $r = 0,284$ ) nas folhas.



## 6 CONCLUSÃO

Na presença do fungicida houve aumento na produtividade, mas não houve efeito das doses de Ni aplicadas.

As doses de Ni associadas ao fungicida reduziu a severidade do oídio nas folhas de soja. O tratamento 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado a 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup> do fungicida reduziu a severidade do oídio a 99%. Esse tratamento proporcionou atividades máximas das enzimas urease, SOD, CAT e POD. Essas enzimas são reguladas pelo Ni e tem um importante papel fisiológico na redução da severidade do oídio na soja.

## REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ARKOUN, M.; JANNIN, L.; LAÏNÉ, P.; ETIENNE, P.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CITERNE, S.; GARNICA, M.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; OURLY, A. A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, Netherlands, v. 362, n.1, p. 79-92, 2013.
- ATTANAYAKE, R. N.; GLAWE, D. A.; McPHEE, K. E.; DUGAN, F. M.; CHEN, W. *Erysiphe trifolii* – a newly recognized powdery mildew pathogen of pea. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 712-720, 2010.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of plant nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, 2001.
- BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, New York, v. 140, n. 2, p. 433-443, 2006.
- BARBOSA, G. F.; CENTURION, M. A. P. C.; FERRAUDO, A. S. Potencial do manejo integrado da ferrugem asiática da soja: severidade da doença, desenvolvimento vegetativo e componentes da produção, cultivar MG/BR-46 (Conquista). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 76-89, 2014.
- BARSUKOVA, V. S.; GAMZIKOVA, O. I., Effects of nickel surplus on the element content in wheat varieties contrasting in Ni resistance. **Agrokhimiya**, Moscow, v. 1, n. 1999, p. 80–85, 1999.
- BOOMINATHAN, R.; DORAN, P. M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 156, n. 2, p. 205-215, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, n. 1, p. 2, 1976.
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p. 801-803, 1987.
- CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureasas as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 90-109, 2016.

CARRIJO, D. R. **Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapirroxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja.** 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo-USP, Piracicaba, 2014.

CIURLI, S. Electronic structure of the nickel ions in the active site of urease. **Chemistry**, Easton, v. 2001, n. 1, p. 99–100, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2015/16, n. 7 - Sétimo levantamento, abril 2016.** Brasília: Conab, 2016. v. 2, n. 9, p. 1-174. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_07\\_10\\_39\\_11\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_07_10_39_11_boletim_graos_abril_2016.pdf)>. Acesso em: 10 abr 2016

DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. (Ed.). **Mineral nutrition and plant disease.** St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 2015. 278 p.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme: simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, Columbus, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, 1975.

DOUCHKOV, D.; GRYCZKA, C.; STEPHAN, U. W.; HELL, R.; BÄUMLEIN, H. Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 28, n. 3, p. 365-374, 2005.

EL SHORA, H. M.; ALI, A. S. Plant growth regulators induced urease activity in *Cucurbita pepo* L. cotyledons. **Acta Biologica Hungarica**, Tihany, v. 67, n. 1, p. 53-63, 2016.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher-plants. **Science**, Washington, v. 222, n. 4624, p. 621-623, 1983.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. **Plant Physiology**, New York, v. 3, n. 76, p. 691-693, 1984.

FABIANO, C. C.; TEZOTTO, T.; FAVARIN J. L.; POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P. Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 6, n. 754, p. 1-4, 2015.

GAD, N.; EL-SHERIF, M. H.; EL-GEREEDLY, N. H. M. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Pakistan, v. 3, n. 1, p. 286-293. 2007

GAJEWSKA, E.; SKLODOWSKA, M.; SLABA, M.; MAZUR, J. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. **Biologia Plantarum**, Netherland, v. 50, n. 4, p. 653-659, 2006.

GENDRE, D.; CZERNIC, P.; CONÉJÉRO, G.; PIANELLI, K.; BRIAT, J. F.; LEBRUN, M.; MARI, S. TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi*

*caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. **The Plant Journal**, Malden, v. 49, n. 1, p. 1-15, 2007.

GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. **Plant and Soil**, Netherland, v. 190, n. 1, p. 153-162, 1997.

GERENDÁS, J.; ZHU, Z., SATTELMACHER, B. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 326, p.1545-1554, 1998.

GERENDÁS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K.; SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Landau, v. 162, n. 3, p. 241-256, 1999.

GERENDAS, J.; SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> or urea as N source. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 65-71, 1999.

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

GODOY, C. V.; MEYER, M. C. **Resistência a fungicidas na cultura da soja**. Londrina: Fundação Meridional de Apoio à Pesquisa Agropecuária, 2014. Artigos. Disponível em: <<http://fundacaomeridional.com.br/artigos/2014/11/10/resistencia-a-fungicidas-na-cultura-da-soja>> Acesso em: 20 jan. 2015.

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 5, p. 420-429, 2006.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Clayton South, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GONZÁLEZ, C. I.; MAINE, M. A.; CAZENAVE, J.; HADAD, H. R.; BENAVIDES, M. P. Ni accumulation and its effects on physiological and biochemical parameters of *Eichhornia crassipes*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 20-27, 2015.

GRAHAM, R. D.; WELCH, R. M.; WALKER, C. D. A role for nickel in the resistance of plants to rust. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE, 3., 1985, Hobart. **Proceedings...** Hobart: Australian Society of Agronomy, 1985. 337 p.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. C.; ROSCOE, R. (Ed.). **Tecnologia e produção: soja 2013/2014**. Maracaju: Fundação MS, 2014. p. 205-231.

HAO, F.; WANG, X.; CHEN, J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. **Plant Science**, Netherland, v. 170, n. 1, p. 151-158, 2006.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, Netherland, v. 125, n. 1, p. 2141-2145, 1968.

HERNANDEZ, F. B. T.; LEMOS FILHO, M. A. F.; BUZETTI, S. **Software HIDRISA e o balanço hídrico de Ilha Solteira**. Ilha Solteira: UNESP / FEIS / Área de Hidráulica e Irrigação, 1995. 45 p. (Série Irrigação, 1).

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 663-667, 1983.

JACOBELIS JUNIOR, W. **Ação de fungicidas no desenvolvimento de plantas de tomate, em condições de ambiente protegido**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles: University of California, 1959. v. 766, n. 1, p. 32-33.

KAZEMI, N.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; FAHIMI, H.; SAADATMAND, S.; NEJAD-SATTARI, T. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 126, n. 3, p. 402-407, 2010.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; RAO, J. N. Control of foliar diseases of groundnut using inorganic and metal salts. **International Arachis Newsletter**, Patancheru, v. 21, n. 1, p. 33-35, 2001.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A., EVANS, H. J. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 8, n. 80, p. 2253-2257, 1983.

KOJIMA, S.; BOHNER, A.; GASSERT, B.; YUAN, L.; VON WIREN, N. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **The Plant Journal**, Malden, v.52, n. 1, p. 30-40, 2007.

KROGMEIER, M. J.; McCARTY, G. W.; SHOGREN, D. R.; BREMNER, J. M. Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar-applied urea. **Plant and Soil**, Netherland, v. 135, n. 2, p. 283-286, 1991.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 1007, n. 1-2, p.115, 2012.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Effects of seed nickel reserves or

externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate fed soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 376, n. 1-2, p. 261-276, 2013.

LIMA, G. P. P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. 1994. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, 1994.

MAHESHWARI, R.; DUBEY, R. S. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Netherland, v. 59, n. 1, p. 37-49, 2009.

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

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja**. 2003. 49 f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2003.

McCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica chimica acta**, Netherland, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MIZUNO, T.; USUI, K.; HORIE, K.; NOSAKA, S.; MIZUNO, N.; OBATA, H. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, n. 8, p. 793-801, 2005.

MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolism. **The Botanical Review**, New York, v. 40, n. 4, p. 395-452, 1974.

NISHIDA, S.; KATO, A.; TSUZUKI, C.; YOSHIDA, J.; MIZUNO, T. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 5, p. 9420-9430, 2015.

OLIVEIRA, T. C.; FONTES, R. L. F.; REZENDE, S. T. D.; HUGO, V.; ALVAREZ, V. Effects of nickel and nitrogen soil fertilization on lettuce growth and urease activity. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 698-706, 2013.

PANDEY, N.; SHARMA, C. P. Effect of heavy metals Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, Netherland, v. 163, n. 4, p. 753-758, 2002.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 15, n. 6, p. 719-725, 1992.

PEREIRA, A. A. **Caracterização molecular do loco Red associado a resistência ao oídio da soja**. 2015. 71 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion–nickel and urease in plants:

still many knowledge gaps. **Plant science**, Netherland, v. 199, n. 1, p. 79-90, 2013.

QUEIROZ, C. S. **Níquel, outros micronutrientes e silício e a ferrugem asiática (*Phakopsora Pachyrhizi*) na cultura da soja (*Glycine Max*)**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.

RAHMAN, H.; SABREEN, S.; ALAM, S.; KAWAI, S. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, Phialdelphia, v. 28, n. 3, p. 393-404, 2005.

RAO, K. V. M.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) *Millspaugh*) in response to Zn and Ni stresses. **Plant science**, Netherland, v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.

REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, v. 1, n. 147, p. 10-24. 2014.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, 1996. n. 53, 1997. (Special Report, 53)

RODAK, B. W. **Níquel em solos e na cultura de soja**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado)–, Universidade Federal do Paraná- UFPR, Curitiba, 2014.

SCALABRIN, E.; RADAELLI, M.; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 103, n. 1, p. 53-60, 2016.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, n. 1, p. 527-530, 1998.

SIRHINDI, G.; MIR, M. A.; SHARMA, P.; GILL, S. S.; KAUR, H.; MUSHTAQ, R. Modulatory role of jasmonic acid on photosynthetic pigments, antioxidants and stress markers of *Glycine max* L. under nickel stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 21, n. 4, p. 559-565, 2015.

SHIMADA, N.; ANDO, T. Role of nickel in plant nutrition II. Effect of nickel on assimilation of urea by plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Hokkaido, v. 51, n. 1, p. 493-496, 1980.

SOIL SURVEY STAFF. **Soil taxonomy**: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2. ed. United States: Department of Agriculture. 1999. 436 p.

- STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. **Plant Physiology**, New York, v. 109, n. 1, p. 169-175, 1995.
- TAN, X. W.; IKEDA, H.; ODA, M. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 84, n. 3, p. 265-273, 2000.
- THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN biochemistry**, Cairo, v. 2013 n.1, p. 1-10., 2013.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. **Oilseeds**: world markets and trade. Washington: USDA Forest Service, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 10 abr 2016
- WALKER, C.D.; GRAHAM, R.D.; MADISON, J.T.; CARY, E.E.; WELCH, R.M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, New York, v. 79, n. 2, p. 474-479, 1985.
- WANG, H.; CAO, C.; KANG, J.; ZENG, F. Resistance to bacterial blight induced by nickel nitrate in rice seedlings. **Journal of Hunan Agricultural University**, Hunan, v. 26, n. 2, p. 119-121, 1999.
- WIEBKE-STROHM, B.; PASQUALI, G.; MARGIS-PINHEIRO, M.; BENCKE, M. ; BÜCKER-NETO, L. B.; BECKER-RITT, A.; MARTINELLI, A. H. S.; RECHENMACHER, C.; POLACCO, J. C.; STOLF, R.; MARCELINO, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; HOMRICH, M. S.; DEL PONTE, E. M.; CARLINI, C. R.; CARVALHO, M. C. C. G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. **Plant molecular biology**, Netherland, v. 79, n. 1-2, p. 75-87, 2012.
- WOOD, B. W.; REILLY, C. C. Nickel and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 2007. p. 215-231.
- XAVIER, S. A.; MELLO, F. E. D.; CANTERI, M. G.; GODOY, C. V. Photosynthesis of soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola* and *Erysiphe diffusa*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 2, p. 156-159, 2015.
- YORINORI, M. A.; KLINGELFUSS, L. H.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; YORINORI, J. T. Effect of time of spraying of fungicide and foliar nutriente on powdery mildew. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 152, n. 3, p. 129-132, 2004.

## CAPÍTULO IV

### Níquel no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja

#### RESUMO

*Phakopsora pachyrhizi* é um fungo basidiomiceto biotrófico causador da ferrugem asiática, considerada a principal doença da soja na América do Sul. O níquel (Ni) é um micronutriente essencial para as plantas, constituinte da enzima urease e apresenta propriedades antifúngicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do Ni na resposta antioxidante, nutricional e no controle da ferrugem asiática. O primeiro experimento foi em placas de Petri contendo ágar e os seguintes tratamentos: (fungicida picoxistrobina + ciproconazole 100 mL L<sup>-1</sup> como controle; 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 5,0 g L<sup>-1</sup> de Ni) com seis repetições. O experimento de campo foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 7 x 2, sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associadas ou não ao fungicida (picoxistrobina + ciproconazole 300 mL p.c. ha<sup>-1</sup>), com quatro repetições, totalizando 56 parcelas. A porcentagem de germinação do fungo em placa de Petri diminuiu significativamente em função das doses de Ni aplicadas. O tratamento 0,5 g L<sup>-1</sup> de Ni equivale a aplicação de 100 g ha<sup>-1</sup> e resultou na redução de 80% da germinação do urediniósporo. A maior dose de Ni aplicada apresentou 100% de inibição da germinação do urediniósporo. A concentração de Ni nas folhas e nos grãos aumentaram linearmente em função da aplicação do nutriente. Houve alta translocações do Ni das folhas para os grãos (r = 0,99). A atividade da urease aumentou até a dose 40 g ha<sup>-1</sup>, seguido de queda da atividade da enzima. Na ausência do fungicida, a concentração foliar de ureia diminuiu até a dose de 40 g ha<sup>-1</sup> e depois permaneceu constante. Por outro lado, na presença do fungicida, a concentração foliar diminuiu até a dose 20 g ha<sup>-1</sup> seguido de aumento. Isso indica que a aplicação acima de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni combinado com fungicida inibe a capacidade da urease quebrar a ureia em amônio e gás carbônico, resultando em altas concentrações de ureia no tecido foliar. A atividade da peroxidase, catalase e superóxido dismutase aumentou até as doses 20 g ha<sup>-1</sup>, 40 g ha<sup>-1</sup> e 60 g ha<sup>-1</sup>, respectivamente. A combinação de doses de Ni e fungicida aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, o que indica a formação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar. Nesse estudo, a aplicação de doses de Ni associado ou não ao fungicida não apresentou efeito na produtividade da soja.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidativas. *Phakopsora pachyrhizi*. Níquel. Urease. Soja.

## Nickel fights soybean rust disease (*Phakopsora pachyrhizi*)

### ABSTRACT

*Phakopsora pachyrhizi* is a biotrophic basidiomycete fungus and currently is the most severe disease in the major soybean growing areas in South America. Nickel (Ni) is an essential micronutrient for higher plants, constituent of urease enzyme and shows antifungal properties. This study aimed to evaluate the role of Ni on antioxidant metabolism, nutritional status and on inhibition of *P. pachyrhizi* urediniospores germination. Each experiment was conducted using Petri dishes containing agar, and the following treatments: (fungicide picoxystrobin + cyproconazole 100 mL L<sup>-1</sup> as control; 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 5.0 g L<sup>-1</sup> of Ni) with six replicates. The field experiment was conducted in randomized plots distributed in factorial scheme 7 x 2, where; seven levels of Ni concentration (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 g ha<sup>-1</sup>) combined or not with fungicide (picoxystrobin + cyproconazole 300 mL a.i. ha<sup>-1</sup>) with four replications, totaling 56 plots. The urediniospore germination in Petri dishes decreased significantly in response to Ni supply. The treatment 0.5 g L<sup>-1</sup> of Ni is equivalent to 100 g ha<sup>-1</sup> foliar application of Ni, and resulted in 80% inhibitory effect on *P. pachyrhizi* urediniospore germination. The highest level of Ni applied showed 100% inhibition of fungus germination. The total Ni concentration in leaves and seeds increased linearly due to foliar Ni application. The results show high translocation of Ni from leaves to grains ( $r = 0.99$ ). The urease activity increased up to 40 g ha<sup>-1</sup>, followed by a decrease of enzyme activity. When Ni is not combined to fungicide, foliar urea concentration decreased up to 40 g ha<sup>-1</sup> and then remained constant in response to Ni application. Moreover, when Ni is combined with fungicide, foliar urea concentration decreased up to 20 g ha<sup>-1</sup>, followed by extremely high increases. These results suggest that application of Ni combined with fungicide above 40 g ha<sup>-1</sup> inhibits urease enzyme's ability to break down urea into ammonium and carbon dioxide, resulting in extremely high urea concentrations in leaf tissues. The activity of peroxidase, catalase and superoxide dismutase increased up to 20 g ha<sup>-1</sup>, 40 g ha<sup>-1</sup> and 60 g ha<sup>-1</sup> of Ni foliar application, respectively. The combination of Ni and fungicide increased the leaf hydrogen peroxide concentration and lipid peroxidation, which indicates the formation of reactive oxygen species in leaf tissues. In this study, the foliar application of Ni combined or not with fungicide showed no effect on soybean yield.

**Key-words:** Antioxidant enzymes. *Phakopsora pachyrhizi*. Nickel. Urease. Soybean.

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merriell) é um dos produtos agrícolas mais consumidos em todo o mundo, com grandes mercados consumidores na ásia, europa e américa (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA, 2016). Nos últimos 20 anos a área de cultivo de soja no Brasil triplicou, e sua produção representa 48,68% de todos produtos agrícolas brasileiros, deste que é atualmente o segundo maior produtor mundial de soja (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB, 2016).

Um dos problemas que impedem a obtenção de maiores produtividades no Brasil é o ocorrência de doenças. A ferrugem asiática, causada pelo fungo *P. pachyrhizi*, é atualmente considerada a doença mais severa na cultura da soja em todo o mundo (LANGENBACH et al., 2016), levando a perdas de até 90% quando não controlada (HARTMAN et al., 2015; GODOY et al., 2016). Só no Brasil a doença já causou perdas de mais de US\$ 10 bilhões desde o seu primeiro surto epidêmico em 2001 (DA SILVA et al., 2014; LANGENBACH et al., 2016).

Várias estratégias de manejo da doença são recomendadas no Brasil como a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura e a utilização de cultivares com gene de resistência (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015). No entanto, os fungicidas são as principais ferramentas para controle da doença (LANGENBACH et al., 2016).

Apesar da grande contribuição que os fungicidas sistêmicos, sítio-específicos, proporcionam no controle de doenças, seu uso intensivo pode ter como consequência a seleção de isolados de fungos menos sensíveis ou resistentes (GODOY et al., 2015a). Populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis a inibidores de desmetilação (DMIs) têm sido relatadas desde 2007 (GODOY, 2011). Desde então, DMIs são comercializados apenas em misturas com os inibidores de quinona oxidase (QoIs), como a mistura de triazois e estrobilurinas (GODOY; BUENO; GAZZIERO, 2015).

Entretanto, mesmo as misturas começaram a se mostrar menos eficientes no controle da doença, demonstrando resistência cruzada, sendo que a eficácia de misturas contendo o picoxistrobina ou protioconazol foram menos afetadas (GODOY et al., 2016). Devido ao elevado número de esporos que produzem, *P. pachyrhizi* juntamente com outros patógenos de plantas policíclicos, tem alta propensão a evoluir (BRADLEY, 2007).

Mesmo tendo surgido fungicidas com novos mecanismos de ação, moléculas inibidoras da succinato desidrogenase (SDHs), sua eficácia ainda não foi comprovada. Dessa maneira, velhos fungicidas multi-sítio, como mancozeb e sulfato de cobre, que apresentam baixo risco de resistência, têm sido novamente testados em misturas entre si e com outros fungicidas sítio-específicos na tentativa de aumentar a eficiência do controle de *P. pachyrhizi* e reduzir os riscos de resistência (GODOY et al., 2016).

Foi demonstrado que o níquel (Ni) pode afetar diretamente os microrganismos patogênicos, como já relatado para bactérias (WANG et al., 2000), fungos (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007; WIEBKE-STROHM et al., 2012). Sua eficácia no controle de *P. pachyrhizi* já foi demonstrado em ensaios in vitro, e em condições de casa de vegetação por Queiroz (2012), sendo aplicado tanto via solo como via foliar. Wiebke-Strohm et al. (2012) também demonstrou que a atividade da enzima urease, da qual o Ni é componente estrutural (DIXON et al., 1975), promove resistência a *P. pachyrhizi*, ao observar que mutantes com gene da urease deletado apresentavam mais lesões em relação a mutantes de soja com genes que expressam a urease.

A metaloenzima urease (EC 3.5.1.5., ureia amidohidrolase), possui dois íons de Ni em seu centro ativo (CIURLI, 2001), e é a única enzima responsável pela hidrólise da ureia em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (DIXON et al., 1975; POLACCO; HOLLAND, 1993), desempenhando importante papel no metabolismo do nitrogênio (POLACCO; MAZZAFERA; TEZOTTO, 2013; FABIANO et al., 2015). Além disso, o Ni é elicitador do metabolismo antioxidante elevando a atividade de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, entre elas a catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), que protegem as células das plantas contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (GONZÁLEZ et al., 2015), contribuindo na defesa da planta (THAKUR; SOHAL, 2013).

Dessa maneira, aplicação de Ni foliar associada ou não a controle químico com fungicidas pode ser uma alternativa viável no manejo da ferrugem na cultura da soja. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação foliar de doses de Ni, associado ou não ao fungicida, no controle da ferrugem asiática com ênfase no estado nutricional e no estresse antioxidativo das plantas de soja.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EXPERIMENTO 1. EFEITO DO NI NA GERMINAÇÃO DE UREDINIÓSPORO DE *P. PACHYRHIZI*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja – Londrina em março de 2016, utilizando a metodologia de germinação de esporos de *P. pachyrhizi* em meio de cultura (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - FRAC, 2006).

O estudo foi conduzindo em delineamento inteiramente casualizado (DIC) 13 tratamentos sendo 12 doses de Ni, utilizando como fonte sulfato de níquel, e um controle contendo 10 ppm do fungicida picoxistrobina + ciproconazole (Approach® Prima), como resumido na Tabela 1, com seis repetições, totalizando 78 unidades experimentais.

**Tabela 1-** Tratamentos aplicados para avaliação dos efeitos “in vitro” de sulfato de níquel sobre *P. pachyrhizi*. Londrina – PR, 2016.

Tratamentos	Concentração do i.a.	Dose equivalente
Controle (Approach ®)	10 ppm	10 ml p.c. ha <sup>-1</sup>
Testemunha	-	-
Ni	0,1 g L <sup>-1</sup>	20 g ha <sup>-1</sup>
Ni	0,2 g L <sup>-1</sup>	40 g ha <sup>-1</sup>
Ni	0,3 g L <sup>-1</sup>	60 g ha <sup>-1</sup>
Ni	0,5 g L <sup>-1</sup>	100 g ha <sup>-1</sup>
Ni	0,8 g L <sup>-1</sup>	160 g ha <sup>-1</sup>
Ni	1,0 g L <sup>-1</sup>	200 g ha <sup>-1</sup>
Ni	2,0 g L <sup>-1</sup>	400 g ha <sup>-1</sup>
Ni	2,5 g L <sup>-1</sup>	500 g ha <sup>-1</sup>
Ni	3,0 g L <sup>-1</sup>	600 g ha <sup>-1</sup>
Ni	3,5 g L <sup>-1</sup>	700 g ha <sup>-1</sup>
Ni	4,0 g L <sup>-1</sup>	800 g ha <sup>-1</sup>

Fonte: elaboração do próprio autor.

Cada parcela correspondeu a uma placa de Petri de tamanho 60 x 15 mm, contendo como substrato ágar – água + solução de cada tratamento. Primeiramente foram separados 13 frascos de 250 ml aos quais foram adicionados cerca de 2,4 g de ágar, em seguida foi adicionada água deionizada em cada frasco em diferentes proporções, de forma a conterem as concentrações desejadas após realizada a mistura com as soluções estoque. Após o preparo das soluções ágar – água elas foram autoclavadas afim de eliminar qualquer contaminante. Foram preparadas duas soluções estoque, uma contendo Ni na concentração 10 g L<sup>-1</sup>, e outra contendo 100 ppm de fungicida. Cada frasco contendo as soluções ágar-água foram levados a forno microondas, e após atingirem uma temperatura suportável ao toque, foram adicionadas

as soluções estoque respeitando as proporções de modo a obter as concentrações desejadas em um volume final de 120 mL. Em seguida os substratos foram vertidos em placas de Petri previamente autoclavadas e identificadas. As placas colocadas para resfriamento por 24 horas, em temperatura em câmara fria antes da deposição da suspensão dos urediniósporos.

Foram coletados uredosporos em casa de vegetação, através de agitação das folhas contendo o inóculo de *P. pachyrhizi*, que naturalmente se desprendem das folhas infectadas. Esse método garante maior germinação em comparação com outros métodos. Aos uredosporos coletados foram adicionados 20 mL de água destilada e 0,1 mL de tween, sendo que em cada placa foram adicionados 0,2 mL da suspensão de uredosporos. Em seguida, as placas foram incubadas em BOD (câmara de germinação) a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período mínimo de quatro horas.

A porcentagem de germinação dos esporos foi realizada através de varredura da placa de Petri, contando 100 esporos por placa aleatoriamente, utilizando microscópio óptico (10X) e contadores, sendo considerado germinado o esporo com tubo germinativo maior que o comprimento do esporo.

## 4.2 EXPERIMENTO 2. APLICAÇÃO DE NI ASSOCIADO OU NÃO AO FUNGICIDA NA SEVERIDADE DA FERRUGEM ASIÁTICA E METABOLISMO ANTIOXIDANTE NA CULTURA DA SOJA.

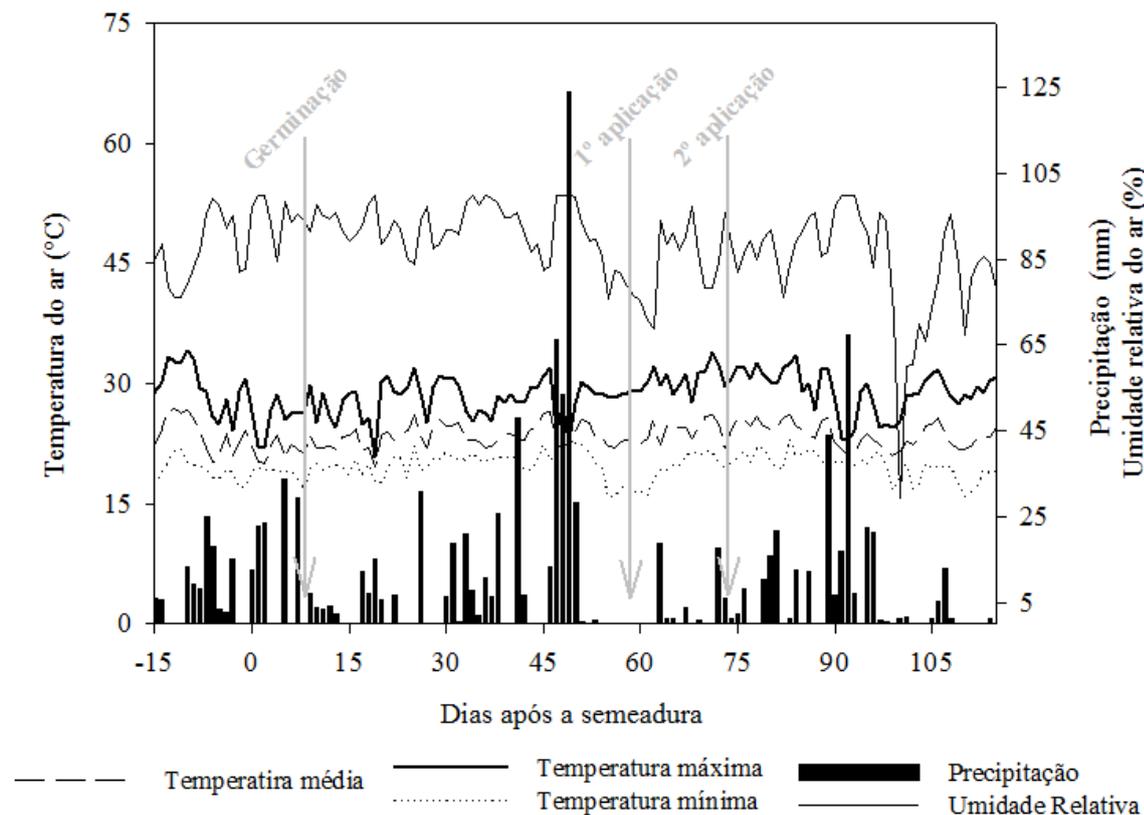
### 4.2.1 Caracterização da área experimental

O estudo foi conduzido de novembro de 2015 a abril de 2016 na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, localizada em Londrina, Paraná, Brasil ( $23^{\circ} 11' \text{ S}$  e  $51^{\circ} 11' \text{ W}$ , altitude de 630 m). O clima em Londrina é descrito segundo a classificação climática de Köppen como Cfa, clima subtropical úmido, com temperatura do ar média do mês mais frio inferior a  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e temperatura do ar média no mês mais quente acima de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, porém sem estação seca definida (ALVARES et al., 2014). Durante a condução do experimento a temperatura diária média variou entre  $27,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $15,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a precipitação média foi de 3,0 mm e a umidade relativa média de 86%, e estão representados na Figura 1.

A análise de solo foi realizada segundo metodologia de Raij et al. (2001) e apresentava as seguintes características químicas: fósforo(resina)  $20,4\text{ mg dm}^{-3}$ ; matéria orgânica  $31,3\text{ g kg}^{-1}$ ; pH cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 5,1; potássio  $0,87\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; cálcio  $4,2\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; magnésio  $1,7\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^+ + \text{Al}$   $\text{mmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; alumínio  $0,05\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; capacidade de troca

catiônica  $10,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  e saturação de bases (V%) - 66%.

**Figura 1-** Dados climáticos de precipitação (mm), umidade relativa do ar (%) e temperatura mínima, média e máxima ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante o desenvolvimento do experimento. O experimento foi instalado próximo à estação meteorológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, localizada em Londrina, Paraná, Brasil.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

#### 4.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O estudo foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial  $7 \times 2$ , sendo sete doses de Ni (0; 10; 20; 40; 60; 80 e  $100 \text{ g ha}^{-1}$ ) utilizando como fonte sulfato de níquel, associadas ou não a dose de  $300 \text{ mL p.c. ha}^{-1}$  fungicida picoxistrobina + ciproconazole (Approach® Prima) com quatro repetições, totalizando 56 parcelas. Foram realizadas duas aplicações, a primeira realizada durante estágio fenológico R1, e a segunda 21 dias após a primeira aplicação no estágio fenológico R3 (RITCHIE; HANWAY; THOMPSON, 1982). As doses de Ni utilizadas no experimento foram baseadas nos trabalhos realizados por (QUEIROZ, 2012; RODAK, 2014). Foi escolhido o fungicida Approach® Prima por possuir registro no Ministério da Agricultura e Pecuária para o controle de doenças da soja, entre elas a ferrugem asiática. Além disso, é um dos únicos fungicida utilizado recentemente que apresenta os ingredientes ativos de interesse para o estudo por sua conhecida ação fisiológica

sobre a planta (estrobilurina + triazol).

### **4.2.3 Instalação e condução do experimento**

O experimento foi conduzido em sistema de plantio direto. A correção da acidez do solo não foi realizada visto que o saturação de bases encontrava-se adequado para as exigências da soja. Foi efetuada dessecação da área, 20 dias antes da semeadura, com Roundup Original (glifosato) ( $4,0 \text{ L ha}^{-1}$ ), Aurora 400 EC (carfentrazone-etílica) ( $200 \text{ mL ha}^{-1}$ ) e 0,5% de óleo mineral. A cultura anterior a soja foi a aveia

O cultivar de soja BMX Potência (crescimento indeterminado, porte alto, resistente ao acamamento, alto índice de ramificação) previamente tratado com Vitavax Thiram 200 SC (3 mL p.c.  $\text{kg}^{-1}$  de semente) foi semeado com densidade de aproximadamente 300.000 plantas  $\text{ha}^{-1}$ . As parcelas experimentais consistiram de quatro linhas de 6 m espaçadas 0,50 m, sendo a área útil as duas linhas centrais, excluindo-se 0,5 m das extremidades.

Concomitantemente as sementes foram inoculadas com com inoculante líquido contendo bactérias fixadoras de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) da marca Agrocete na dose 100 ml  $50 \text{ kg}^{-1}$  de sementes Para adubação de semeadura com NPK foi aplicado  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  do formulado 00-20-20.

O experimento foi semeado no dia 23 de novembro de 2015, e as plântulas emergiram 7 dias após o plantio, no dia 30 de novembro de 2015.

Durante o ciclo de desenvolvimento das plantas o controle fitossanitário foi efetuado com Roundup Original (glifosato) ( $4,0 \text{ L ha}^{-1}$ ), Premio (clorantraniliprole) ( $50 \text{ mL ha}^{-1}$ ), Engeo Pleno (lambda-cialotrina + tiametoxam) ( $150 \text{ mL ha}^{-1}$ ), Connect (imidacloprido + beta-ciflutrina) ( $0,8 \text{ L ha}^{-1}$ ) e Acefato Fersol 750 SP (acefato) ( $750 \text{ mL ha}^{-1}$ ).

### **4.2.4 Variáveis analisadas**

#### ***4.2.4.1 Avaliações do crescimento e produtividade***

No estádio R8 foi efetuada a avaliação da produtividade colhendo-se as plantas da área útil. Efetuou-se também a determinação do peso de 100 grãos. A umidade foi padronizada em 13%.

#### ***4.2.4.2 Avaliação da severidade da doença***

Foram realizadas duas avaliações de severidade, a primeira em R 5.4 e a segunda em R5.5. A severidade da doença foi avaliada através de sistema de notas, considerando-se a

porcentagem de área foliar com sintomas visíveis da doença, avaliada com auxílio de escala diagramática (GODOY; KOGA; CANTERI, 2006).

#### ***4.2.4.3 Índice de vegetação por diferença normalizada***

Foram realizadas também duas avaliações de índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) aos 3 e 6 dias após a avaliação de severidade realizada em R5.5 como ilustrado na Figura 2. As avaliações de NDVI, realizadas com o equipamento Greenseeker, mostram altas correlações com a severidade e com a produtividade (HIKISHIMA, 2010).

Análises por sensoriamento remoto têm sido utilizadas para avaliar doenças diversos patossistemas, mas não dispensam a avaliação de severidade, uma vez que outros fatores que causam estresse na cultura podem interferir nos valores de NDVI. A vantagem da avaliação de NDVI é a de que ela é rápida, precisa e evita a subjetividade (HIKISHIMA, 2010).

**Figura 2-** Avaliação de NDVI utilizando o aparelho GreenSeeker



Fonte: Imagens cedidas pela Embrapa Soja, Londrina-PR.

#### **4.2.4.4 Análise nutricional**

No estágio R2, doze dias após a aplicação dos tratamentos, foi coletado o primeiro trifólio recém expandido de 20 plantas de cada parcela. O material, após seco, foi utilizado para quantificar os teores foliares dos macro e micronutrientes. Os grãos coletados em R8 também foram analisados.

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl, após digestão sulfúrica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Para quantificação dos demais nutrientes efetuou-se digestão nitroperclórica (JOHNSON; ULRICH, 1959) e incineração no caso do boro (ALCARDE, 1969). A determinação foi realizada em espectrofotometria de absorção atômica, com exceção do fósforo e enxofre determinado em espectrofotometria e do potássio fotometria de chama.

#### **4.2.4.5 Índice de clorofila**

No estágio R2, foram realizadas medições indiretas de clorofila com um medidor eletrônico portátil de intensidade da cor verde das plantas (SPAD), modelo Digital SPAD 502 (MINOLTA). A leitura foi efetuada em três plantas de cada parcela, em cinco pontos da terceira folha da haste principal do terço superior.

#### **4.2.4.6 Análises enzimáticas**

##### **4.2.4.6.1 Coleta do material**

Foi coletado o primeiro trifólio totalmente expandido das plantas para quantificação da atividade das enzimas urease (EC 3.5.1.5.), dez dias após a aplicação dos tratamentos, no estágio R2, que foram condicionados em gelo até realização da análise.

Uma segunda coleta foi realizada aos 11 dias após a aplicação dos tratamentos, no estágio R2, sendo coletado o primeiro trifólio totalmente expandido de 15 plantas de cada parcela, que foram condicionados em nitrogênio líquido, e utilizados para quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, conteúdo de ureia, conteúdo de ácido chiquímico, teor de proteína solúvel, superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Esse material foi macerado em N líquido e armazenado em freezer -80°C até serem processadas as análises.

##### **4.2.4.6.2 Atividade da urease (EC 3.5.1.5)**

A atividade da urease foi determinada em função da produção de N-NH<sub>4</sub>, segundo metodologia de McCullough (1967) e o extrato foi obtido segundo metodologia descrita por

Hogan, Swift e Done (1983). Após a coleta, 0,2 g da massa fresca foliar foi inserida em 8 mL de tampão fosfato de sódio com ureia pH 7.4 e foram mantidos em banho-maria a 30°C com agitação durante 3 horas para extração. A uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionado 2,5 mL do reagente I: fenol ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e nitroprussiato de sódio (SNP) ( $170 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), seguido de agitação, e em seguida 2,5 mL do reagente II: hidróxido de sódio ( $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ ), fosfato dissódico ( $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ) e hipoclorito de sódio (3%  $\text{Cl}_2$ ). Efetuou-se nova incubação em banho-maria a 37 °C por 35 minutos. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ .

#### **4.2.4.6.3 Conteúdo de peróxido de hidrogênio**

O conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi determinado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), segundo (ALEXIEVA et al., 2001). Foram pesados 100 mg do material vegetal congelado, ao qual foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% em eppendorf, esse material foi homogeneizado através de agitação em vortex e em seguida foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos, a 4 °C em centrífuga refrigerada. A 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 800  $\mu\text{L}$  de solução de KI (1M). As amostras foram mantidas em gelo durante uma hora. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram realizadas leituras de absorbância a 390 nm. O conteúdo de peróxido de hidrogênio no tecido foliar foi calculado com base numa curva padrão e os resultados expressos em  $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### **4.2.4.6.4 Peroxidação lipídica**

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído, segundo metodologia de Heath e Packer (1968). A extração foi realizada pela homogeneização de 200 mg de material vegetal em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) + polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20%. O material homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. A 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado 1 mL de solução de ácido tricloroacético 20% + 0,5% de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram mantidas em banho-seco a 95 °C durante 30 minutos, e em seguida transferida para gelo onde permaneceu por mais 10 minutos. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 minutos. Foram realizadas leituras das amostras em dois comprimentos de onda, uma a 532 nm e outra a 600 nm. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### **4.2.4.6.5 Determinação de ureia**

A quantidade de ureia foi determinada como descrito em Kojima et al. (2007). Foi adicionado a 0,5 g de material vegetal 1 mL de ácido fórmico (10 mM) seguido de agitação em vortex e centrifugação a 13200 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos. Primeiramente foram preparados reagentes que dariam origem ao reagente final para a determinação, sendo um reagente ácido contendo cloreto férrico hexahidratado, e ácido ortofosfórico, que ao ser misturado com ácido sulfúrico, formou o reagente ácido misto; e dois reagentes colorimétricos, um contendo tiosemicarbazida, e o outro contendo diacetilmonoxime, da mistura dos dois reagentes colorimétricos obtém-se o reagente colorimétrico misto. O reagente final, chamado reagente desenvolvedor de cor, foi preparado somente no dia do ensaio, através da mistura de água ultrapura, do Reagente Ácido Misto e do Reagente Colorimétrico Misto, nas proporções de 1:1:1. Para a determinação, foram utilizados 100 µL da amostra, aos quais foram adicionados 1000 µL do reagente preparado. Eles foram incubados a 99 °C por 15 minutos, sob agitação a 750 rpm, e em seguida foram esfriados por 5 minutos em gelos e mantidos em ambiente escuro. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em µmol ureia g<sup>-1</sup> MF.

#### **4.2.4.6.6 Determinação do ácido chiquímico**

Para a determinação de ácido chiquímico foi utilizado o método modificado de Gaitonde e Gordon (1958) descrito por (SINGH; SHANER, 1998). Para isso, foi adicionado a 250 mg do material vegetal, 750 µL de ácido clorídrico (0,25N), numa proporção de 1:3. O material foi homogeneizado através de agitação em vortex e em seguida foi levado para centrifugação a 14.000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos. A 20 µL da amostra foram misturados 0,5 mL de solução de ácido periódico (1%). A solução ficou descansando durante 3 horas. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de hidróxido de sódio (1N), e 0,3 mL de glicina (0,1M). As leituras foram realizadas imediatamente em espectrofotômetro a 380 nm e os resultados expressos em µmol de ácido chiquímico g<sup>-1</sup> MF.

#### **4.2.4.6.7 Extração de proteínas e enzimas antioxidantes**

O material vegetal armazenado em freezer -80 °C, foi macerado em nitrogênio líquido em um almofariz. Posteriormente, o extrato foi obtido aproximadamente 0,3 g de material vegetal processado, o qual foi transferido para tubos falcon de 15 mL, onde foi adicionado 5

mL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 6,8, contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 1mM, ditioneitol (DTT) 3mM, e polivinilpirrolidona (PVPP) 4% (p/v), utilizando metodologia adaptada de Gomes Junior et al. (2007). O material foi homogeneizado em mixer e em seguida foi centrifugado em centrífuga refrigerada à 9.000 rpm por 20 minuto à 4°C. O sobrenadante foi transferido para eppendorfs, e posteriormente utilizado para quantificação de proteínas e da atividade das enzimas antioxidativas.

#### **4.2.4.6.8 Determinação de proteínas**

A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Foram pipetados em tubos de ensaio 100 µL da alíquota e 5 mL do reagente Bradford, que havia sido preparado previamente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg proteína g<sup>-1</sup> MF.

#### **4.2.4.6.9 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada de acordo com (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A reação foi conduzida em câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, a 25 °C. Foi adicionado 50 µL da amostra a 5 mL da solução: tampão fosfato de sódio pH 7,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>), metionina (13 mmol L<sup>-1</sup>), nitroblue tetrazólio (NBT) (75 mmol L<sup>-1</sup>), EDTA (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e riboflavina (2 µmol L<sup>-1</sup>). As amostras foram acondicionadas na caixa, tampada e livre de qualquer luz exterior, e mantidas sob a iluminação da caixa por 15 minutos. Concomitantemente, a mesma solução foi mantida no escuro em tubos de ensaio encapados com papel alumínio, consistindo no branco de cada amostra. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas através de agitação em vortex. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em U SOD mg proteína<sup>-1</sup>.

#### **4.2.4.6.10 Catalase (CAT, 1.11.1.6)**

A atividade da catalase foi determinada monitorando-se a degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segundo metodologia de (AZEVEDO et al., 1998). Em 25 µL do extrato proteico foi adicionado 1 mL da solução tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 2,5 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Imediatamente após as amostra foram agitadas em vortex. A determinação, da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi efetuada em intervalos de 2 min à 25 °C em espectrofotômetro a 240 nm e os resultados expressos em nmol mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.6.11 Peroxidase (EC. 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada segundo (LIMA, 1994). Em 150  $\mu\text{L}$  do extrato proteico foram adicionadas as soluções tampão fosfato pH 6,7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), amino-antiperina e fenol, com posterior incubação em banho-maria a 30 °C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de álcool etílico e as amostras foram agitadas em vortex. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ .

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os conjuntos de dados considerados, foi analisada a normalidade dos dados, utilizando-se o teste de Anderson-Darling e verificando-se a homocedasticidade dos dados com o teste da equação da variância (ou teste de Levenn's). Os dados foram submetidos à análise de variância, com níveis de significância de 0,05 de probabilidade, pelo teste F. Quando significativas, as médias foram submetidas ao teste Tukey em nível de 0,05 de probabilidade utilizando-se o programa estatístico Minitab e Sigmaplot.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITO DO NI NA GERMINAÇÃO E SEVERIDADE DA FERRUGEM

O Ni apresenta efeito direto e indireto sobre microrganismos causadores de doenças (REIS et al., 2014). A aplicação foliar de sais de Ni começou a ser estudada na década de 1930, sendo efetiva no controle de ferrugens em cereais (MISHRA; KAHR, 1974; GERENDÁS et al., 1999). Na época a eficácia do Ni era atribuída ao seu efeito tóxico sobre o fungo (MISHRA; KAHR, 1974). De fato, Kishore, Pande e Rao (2001) realizando ensaios realizados *in vitro* observaram que  $\text{NiCl}_2$  nas concentrações de 1 a 10 mM reduziram a germinação dos fungos *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis*, fungos responsáveis respectivamente pela mancha-de-mycosphaerella e pela ferrugem do amendoim, em mais de 98%.

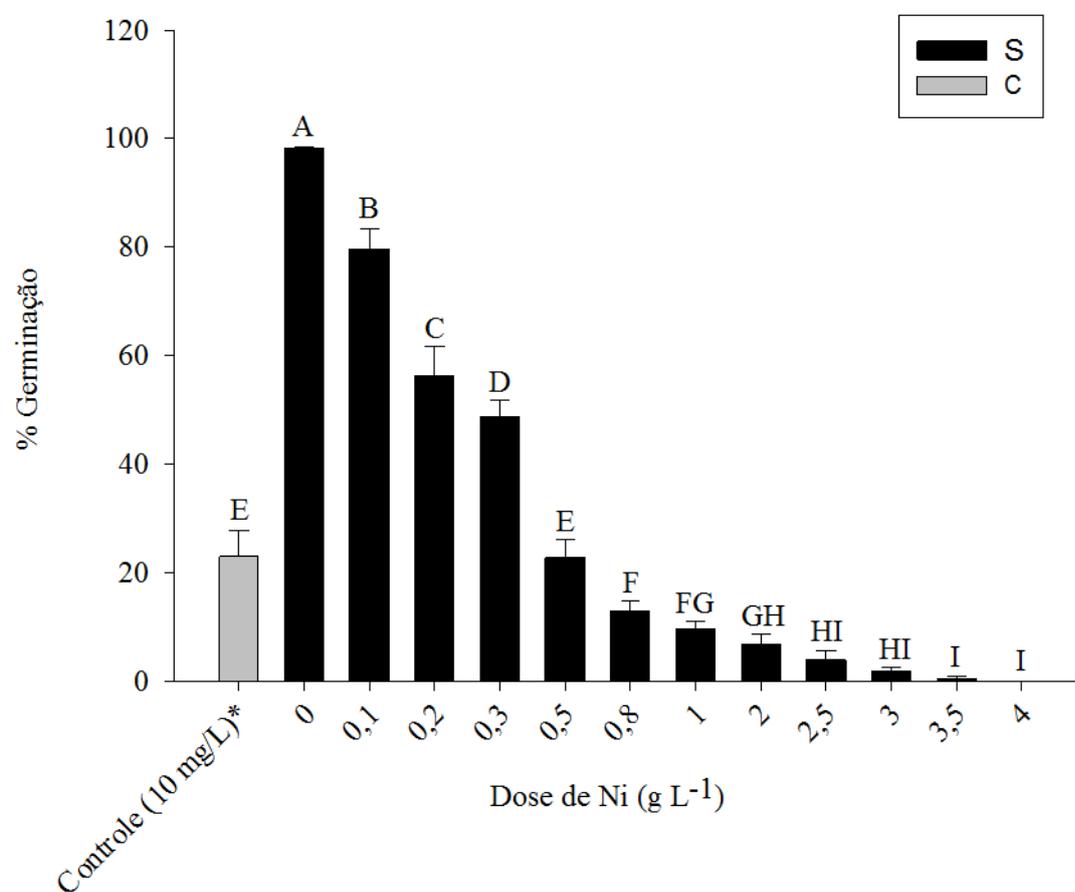
Queiroz (2012) observou redução na germinação de esporos de *P. pachyrhizi* em ensaio *in vitro* com doses crescentes de Ni, chegando a uma germinação de 18,2% para a dose de 0,6  $\text{g L}^{-1}$ . Resultados similares também foram observados no presente estudo, no qual o aumento de doses de Ni reduziram a porcentagem de germinação de esporos de ferrugem chegando a germinações inferiores a 5 % a partir de 2,5  $\text{g L}^{-1}$  (Figura 3). Além disso, a dose 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de

Ni foi estatisticamente igual ao controle contendo 10 ppm de picoxistrobina + ciproconazol, correspondendo a aplicação de 10 mL L<sup>-1</sup> do produto comercial.

Entretanto, comparando as germinações para as doses testadas em ambos trabalhos, 0,1 0,2 e 0,30 g L<sup>-1</sup> de Ni, enquanto Queiroz (2012) obteve 72,3%, 21,7% e 20,2% de severidade, respectivamente. No presente trabalho foram observadas as severidades 79,6%, 56,3% e 48,83%, essa diferença é causada pelas diferenças de metodologia entre os trabalhos, já que o autor aplicou o Ni diretamente na solução de esporos, enquanto que no presente trabalho o Ni foi adicionado ao meio de cultura (ágar-agua).

Resultados positivos do Ni no controle da ferrugem asiática em plantas também foram observados. Em condições de casa de vegetação, Queiroz (2012) observou redução na severidade de *P. pachyrhizi* para a aplicação de doses de Ni via solo e via foliar, sendo que esses resultados foram estatisticamente iguais aos obtidos pelo controle contendo azoxistrobina + ciproconazol. Além disso, a aplicação de sais de Ni reduziu a incidência de doenças causadas por *Puccinia hemerocallidis* em *Hemerocallis* (REILLEY; CRAWFORD; BUCK, 2005), *Helminthosporium oryzae* e *Pyricularia oryzae* em arroz (WOOD; REILLY, 2007), *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis* em amendoim (KISHORE; PANDE; RAO, 2001; WOOD; REILLY, 2007). *Fusicladosporium caryigenum* em pecã (WOOD et al., 2011) e quando aplicado via solo reduziu as lesões causadas por *Uromyces phaseoli* em feijão caupi (GRAHAM et al. 1985).

**Figura 3-** Porcentagem de germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* *in vitro* sob diferentes concentrações de Ni e sob 10 mg L<sup>-1</sup> de picoxistrobina + ciproconazol.

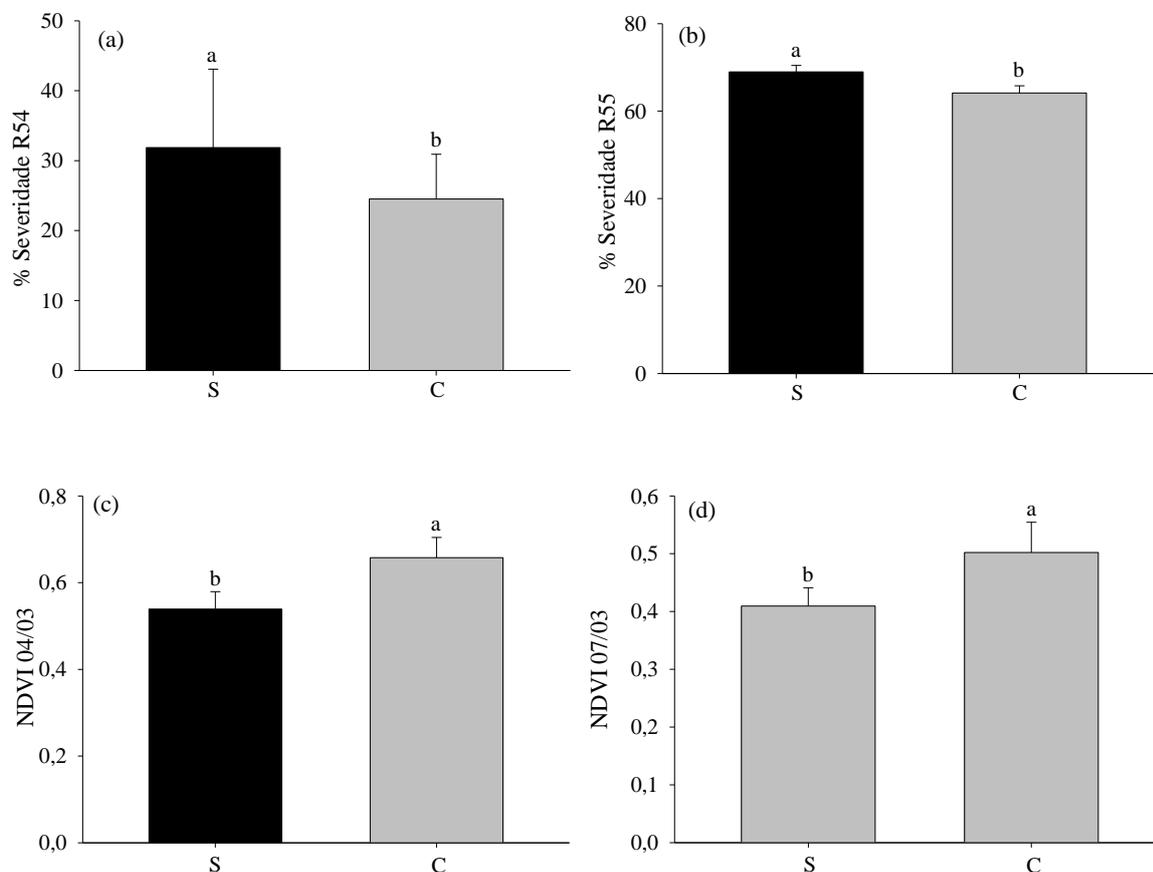


Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 6 repetições ( $n = 6$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Apesar de apresentar diferenças na germinação dos esporos de ferrugem no ensaio *in vitro*, em condições de campo não houve diferença estatística para as doses de Ni. Para as duas avaliações de severidade realizadas (R 5.4 e R 5.5) houve efeito significativo apenas para o fungicida, sendo que os tratamentos em que o produto foi aplicado apresentaram menores severidades (Figura 3-A e 3-B). Em R4.5 foi observada uma severidade de 31,86 % para os tratamentos sem fungicida e 24,52 % para os tratamentos com fungicida (Figura 3-A), já em R5.5 foi observada uma severidade de 68,95% e 64,14% para os tratamentos sem e com fungicida respectivamente (Figura 3-B), sendo que o terço inferior das plantas já apresentava 100 % de desfolha e o terço médio entre 80 e 90% de desfolha.

**Figura 4-** Severidade de ferrugem avaliada nos estágios fenológicos R 5.4 (a) e R 5.5 (b) em plantas de soja, e índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) avaliados em 04 de março R5.5(c) e em 07 de março R5.5 (d) na área experimental em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).  
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Para os ensaios cooperativos da safra 2014/2015, a aplicação de 3 doses de picoxistrobina + ciproconazol resultou em 32,3 % de severidade de ferrugem (GODOY et al., 2015), apesar de apresentar menor severidade em comparação com o presente estudo, é importante ressaltar que outros produtos comerciais apresentaram melhor desempenho com severidades em torno de 7%. Além disso, comparando a porcentagem de severidade apresentadas pelas testemunhas nas últimas safras, é possível notar que houve um aumento na severidade da doença, que passou de 59,9% na safra 2012/2013 (GODOY et al., 2013), para 66% na safra 2013/2014 (GODOY et al., 2014) e para 76,9% na safra 2014/2015 (GODOY et al., 2015).

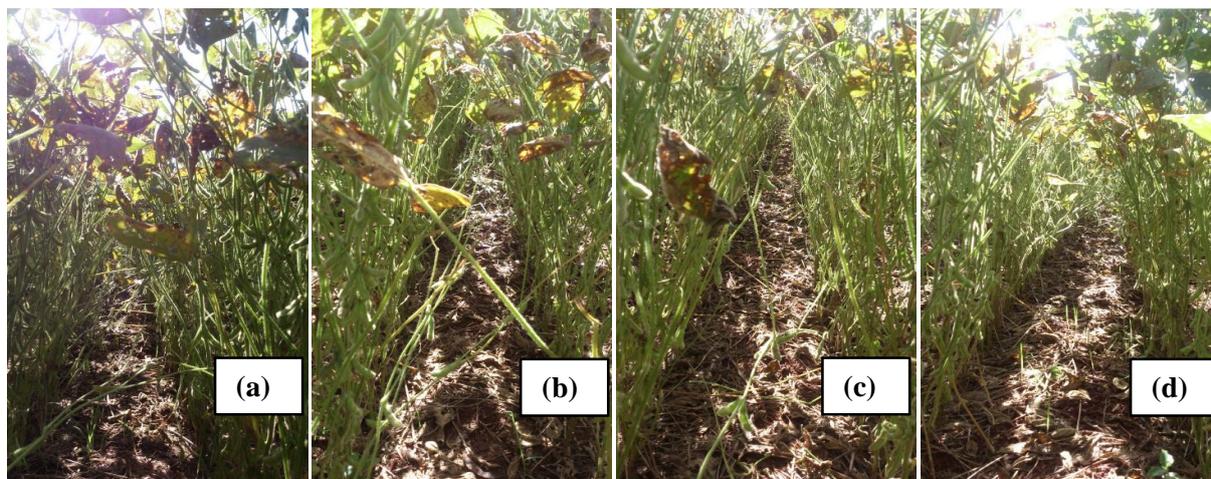
A ferrugem asiática provoca uma desfolha muito acentuada em poucos dias. O presente estudo está ilustrado na Figura 5, na qual percebe-se total desfolha (manchas em marrom) nas bordaduras do experimento causado pelo fungo. A perda de folhas (Figura 6) compromete a fotossíntese e conseqüentemente a formação de açúcares e carboidratos para o crescimento da planta e enchimento do grão.

**Figura 5-** Visão geral do experimento instalado no município de Londrina-PR. As manchas de coloração marrom ao lado direito é a desfolha causada pela ferrugem asiática.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

**Figura 6-** Visão geral do terço-médio da planta demonstrando a perda de folhas. Testemunha (A); tratamento 40 g ha<sup>-1</sup> (B); tratamento 80 g ha<sup>-1</sup> (C); tratamento 100 g ha<sup>-1</sup> (D).



Fonte: Elaboração do próprio autor.

O índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) quantifica através de sensoriamento remoto a vegetação da área e, como esperado, apresentou resultado inverso ao de severidade nas duas datas de avaliação, com maiores valores para os tratamentos com fungicida, demonstrando que estes apresentavam mais folhas em comparação com os tratamentos sem o produto. O NDVI para os tratamentos sem fungicida foi de 0,54 na primeira avaliação para 0,41 na segunda, já para os tratamentos com fungicida o NDVI foi de 0,66 para 0,50 da primeira para a segunda avaliação, demonstrando a agressividade da doença, que em 3 dias reduziu a área fotossinteticamente ativa.

A porcentagem de severidade avaliada em R5.4 teve correlação positiva com a severidade avaliada em R5.5 ( $r = 0,341$ ), e com os teores de P ( $r = 0,272$ ), S ( $r = 0,264$ ) e Cu ( $r = 0,315$ ) nos grãos. E correlação negativa com o NDVI avaliado em 04 de março ( $r = -0,505$ ) e 07 de março ( $r = -0,528$ ), e com os teores foliares de Ca ( $r = -0,332$ ), Mg ( $r = -0,263$ ) e Mn ( $r = -0,268$ ). A porcentagem de severidade avaliada em R5.5 apresentou correlação negativa com o NDVI avaliado em 04 de março ( $r = -0,747$ ) e 07 de março ( $r = -0,699$ ), e com o teor foliar de K ( $r = -0,275$ ) (Tabela 2).

Hikishima et al. (2010) verificaram alta correlação entre o NDVI e a produtividade avaliando plantas de soja com ferrugem, o mesmo não foi observado no presente trabalho por não ter sido observada diferenças estatísticas para os tratamentos sobre a produtividade. O NDVI avaliado em 04 de março apresentou correlação positiva com o NDVI avaliado em 07 de março ( $r = 0,963$ ), com os teores foliar de P ( $r = 0,435$ ), Mn ( $r = 0,329$ ) e Zn ( $r = 0,279$ ), e com o teor de Mn nos grãos ( $r = 0,362$ ), e correlação negativa com o teor de Cu nos grãos ( $r = -0,304$ ). Já o NDVI avaliado em 07 de março teve correlação positiva com os teores foliares de P ( $r = 0,451$ ), Ca ( $r = 0,333$ ), Mg ( $r = 0,332$ ), Cu ( $r = 0,29$ ), Mn ( $r = 0,325$ ) e Zn ( $r = 0,281$ ), e com o teor de Mn nos grãos ( $r = 0,360$ ), e correlação negativa com o teor de Cu nos grãos ( $r = -0,434$ ) (Tabela 2).

## 5.2 ATIVIDADE DA UREASE E CONCENTRAÇÃO DE UREIA

No presente estudo, a aplicação foliar de Ni aumentou a atividade da enzima urease em comparação com o tratamento sem Ni, porém não houve diferença estatística entre as doses de Ni sem a associação com o fungicida (Figura 7-A). Por ser constituinte da enzima urease, a aplicação de doses de Ni aumenta a atividade da enzima em plantas de soja como evidenciado por Eskew, Welch e Norvell (1984), Klucas et al. (1983) e Krogmeier et al. (1991) utilizando de 0,001 a 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Ni em solução nutritiva. O mesmo também foi observado em cereais (BROWN; WELCH; CARY, 1987), cucurbitáceas (GERENDÁS;

SATTELMACHER, 1997), arroz (GERENDÁS; ZHU; SATTELMACHER, 1998), e pecã (*Carya illinoensis*) (BAI; REILLY; WOOD, 2006), tomate (GAD; EL-SHERIF; EL-GEREEDLY, 2007) e alface (OLIVEIRA et al., 2013).

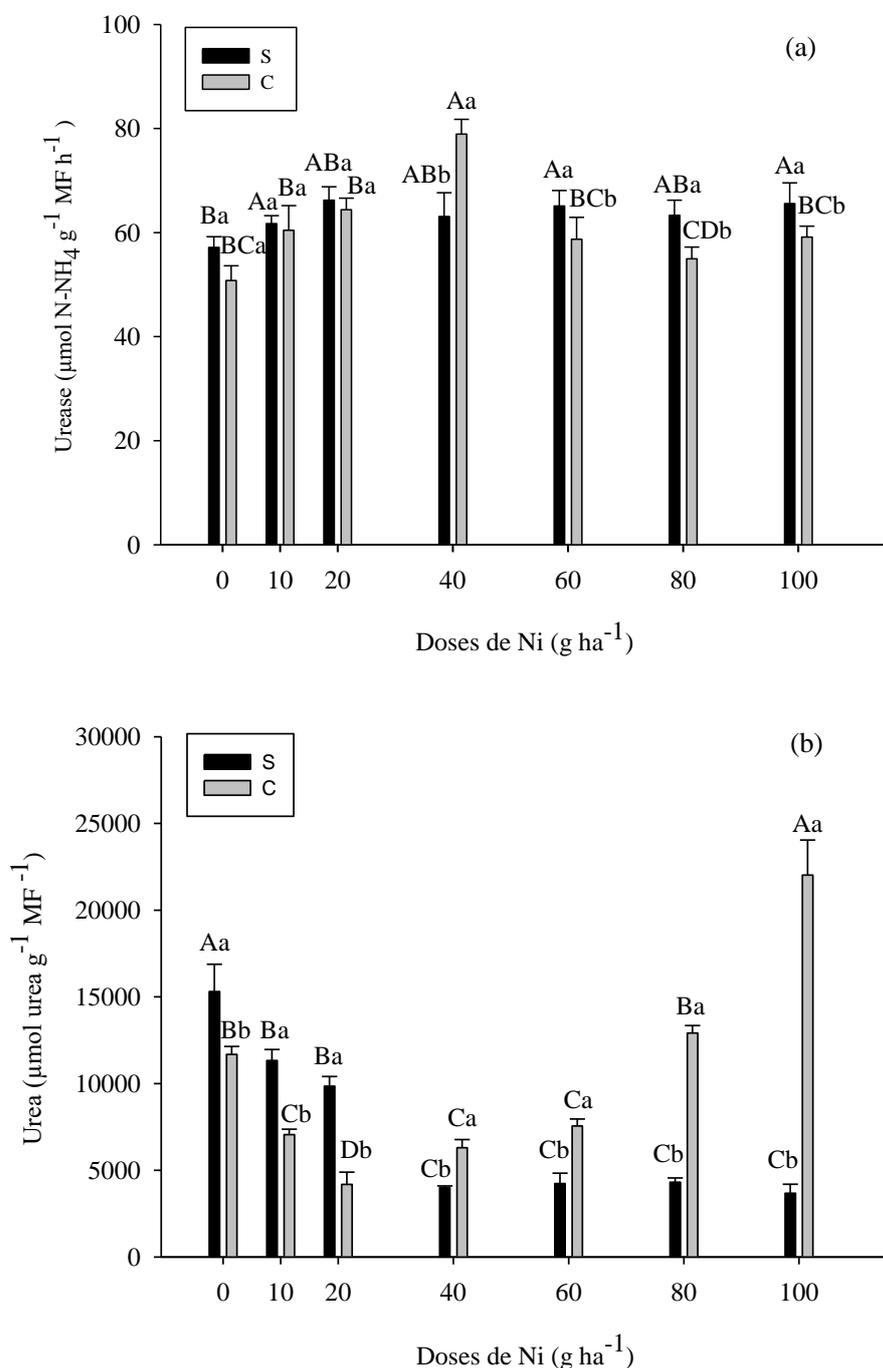
Em plantas de soja, Klucas et al. (1983), Rodak (2014) e Lavres, Franco e de Sousa Câmara (2016) aplicando doses crescentes de Ni obtiveram efeito quadrático para a atividade da urease. No presente trabalho o mesmo efeito só foi observado para os tratamentos de Ni associado ao fungicida, sendo que apesar de apresentar aumento para a atividade da urease, os tratamentos em que o Ni foi aplicado sozinho não apresentaram diferenças entre si.

A aplicação de fungicida sem a combinação de doses de Ni (controle), e em combinação com a dose 20 g ha<sup>-1</sup>, não influenciou a atividade da enzima urease (Figura 7-A). Enquanto que em combinação com a dose 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni houve efeito sinérgico do fungicida sobre a atividade da enzima, para as demais doses de Ni o fungicida exerceu efeito antagônico. Estudando o efeito da aplicação de triazol contendo triadimefon ou hexaconazole no tratamento de sementes, El Shora e Ali (2016) observaram aumento na atividade da urease em cotilédones de abobrinha.

A atividade da urease teve correlação positiva com a POD ( $r = 0,326$ ), como observado na Tabela 1, e correlação negativa com o conteúdo de ureia ( $r = -0,436$ ), isso porque a urease é a enzima responsável pela catálise da hidrólise da ureia em amônia e gás carbônico, logo o aumento na atividade enzimática da urease vem acompanhado da redução no conteúdo de ureia.

Em condições de ausência do fungicida, houve redução na concentração de ureia em resposta a aplicação de Ni. A concentração de ureia foliar permanece constante a partir da dose 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni (Figura 7-B). Isso indica que a urease não hidrolisa ureia em amônia e gás carbônico em doses de Ni acima de 40 g ha<sup>-1</sup>, indicando uma possível inativação da enzima. Esse fenômeno é mais acentuado nos tratamentos de Ni na presença do fungicida, que potencializa o efeito de inativação da urease e conseqüentemente o acúmulo de ureia no tecido. Nesse estudo, doses de Ni acima de 40 g ha<sup>-1</sup> associado o fungicida aumenta expressivamente a concentração de ureia no tecido foliar (Figura 7-B). No entanto, não foi observado sintomas de toxidez de Ni nas folhas de soja nas doses utilizadas nesse estudo.

**Figura 7-** Atividade da urease (a) e concentração de ureia (b) no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Plantas de soja deficientes em Ni apresentaram acúmulo de ureia nos tecidos (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1997; ESKEW; WELCH; NORVELL 1983; ESKEW; WELCH; NORVELL, 1984), o mesmo foi observado em trigo, colza, girassol (GERENDÁS; SATTELMACHER, 1997), arroz (GERENDÁS; ZHU; SATTELMACHER, 1998), tomate (SHIMADA; ANDO, 1980), e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (WALKER et al., 1985). Kutman, Kutman e Cakmak (2013a) observaram também que a aplicação foliar de Ni amenizou sintomas de toxicidade causados pelo acúmulo de ureia em soja, resultados semelhantes foram obtidos com a adição de Ni a solução nutritiva no cultivo de tomate (TAN; IKEDA; ODA, 2000) e colza (ARKOUN et al. 2013).

Apesar de não apresentar maior atividade da urease, a aplicação de fungicida sem a combinação de doses de Ni (controle) e combinado as doses 10 e 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni reduziu de forma decrescente o conteúdo de ureia, apresentando menores concentrações quando comparadas aos tratamentos sem o fungicida (Figura 7-B). Entretanto, a partir da dose 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ao fungicida houve aumento do conteúdo de ureia, sendo que para a dose de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni associado ao fungicida, o conteúdo de ureia foi superior ao conteúdo apresentado pela testemunha sem Ni, demonstrando que quando associado as maiores doses de Ni o fungicida leva a um maior acúmulo de ureia.

A ureia teve correlação positiva com o conteúdo de MDA ( $r = 0,442$ ), com o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r = 0,439$ ), com o teor de proteína solúvel ( $r = 0,440$ ), atividade da CAT ( $r = 0,299$ ), e com o teor foliar de P ( $r = 0,309$ ). E apresentou correlação negativa com a SOD ( $r = - 0,552$ ) e POD ( $r = - 0,433$ ) como observado na Tabela 2.

### 5.3 TEOR PROTEICO E ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS

A aplicação foliar de Ni sem associação com fungicida apresentou redução gradativa na concentração de ácido chiquímico com o aumento das doses de Ni (Figura 8-A). Já para os tratamentos com fungicida não houve influência das doses de Ni, e a concentração de ácido chiquímico se manteve mais baixa em relação aos tratamentos sem o fungicida, se igualando estatisticamente aos tratamentos sem fungicida apenas para a dose de 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni. Em estudo de correlação de Pearson o ácido chiquímico apresentou correlação negativa com os teores de Ni foliar ( $r = - 0,341$ ) e nos grãos ( $r = - 0,283$ ).

Outros trabalhos também demonstraram interação entre o acúmulo de ácido chiquímico e os teores de Ni, como Zobiolo et al. (2010) que observaram que o acúmulo de ácido chiquímico causado pela aplicação de glifosato, era acompanhado por deficiência de Ni em plantas de soja. Kutman, Kutman e Cakmak (2013a) observaram também que a aplicação

foliar de Ni era responsável por amenizar sintomas de deriva de glifosato em trigo, entre os quais reduzir o acúmulo de ácido chiquímico.

O ácido chiquímico é um importante intermediário no metabolismo das plantas, sendo responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (COLE, 1985), assim, além de estar envolvido na síntese proteica, o ácido chiquímico também é uma molécula chave na biossíntese de vários metabólitos secundários importantes também no metabolismo de defesa das plantas como flavonoides, ligninas, derivados indol e vários alcaloides aromáticos (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016).

De forma que no presente estudo o ácido chiquímico teve correlação positiva com a porcentagem de severidade avaliada em R5.5 ( $r = 0,603$ ) e correlação negativa com o NDVI avaliado em 04 de março ( $r = - 0,516$ ) e em 07 de março ( $r = - 0,458$ ), demonstrando que seu acúmulo possivelmente resultou em menor síntese de metabólitos secundários responsáveis pela defesa da planta. Além disso, o ácido chiquímico também apresentou correlação positiva com o teor de proteína solúvel ( $r = 0,325$ ) e com o teor de K nos grãos ( $r = 0,332$ ), e negativa com o teor foliar de K ( $r = - 0,313$ ).

Alguns dos metabólitos secundários originados na rota do ácido chiquímico, como flavonóides, antocianinas e fenóis (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016), juntamente com enzimas como SOD, CAT e POD, desempenham papel na defesa da planta contra espécies reativas de oxigênio (DAS; KAR; MISHRA, 1978; PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992; SEREGIN; IVANOV, 2001; THAKUR; SOHAL, 2013). As espécies reativas de oxigênio são comumente produzidas, porém sua produção aumentada quando a planta é submetida condições de estresse, como no caso da ocorrência de doenças (THAKUR; SOHAL, 2013).

A atividade das enzimas antioxidantes podem variar de acordo com a duração do tratamento e do tipo de estresse, e entre espécies e partes de plantas (CHEN; HUANG; LIU, 2009). Ni à concentração de 0,5 mM aumentou as atividades de SOD e POD e diminuiu a atividade de CAT em mudas de *Cajanus cajan* (RAO; SRETTY, 2000). A mesma concentração entretanto reduziu as atividades de CAT e POD em folhas de repolho (PANDEY; SHARMA, 2002), e aumentou a atividade de SOD, CAT e POD em células de cafeeiro (GOMES JUNIOR et al., 2006).

A atividade da SOD aumentou a partir da dose 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni, para os tratamentos sem fungicida, e se manteve igual para as doses maiores, com exceção da dose 60 g ha<sup>-1</sup> de Ni que teve maior atividade enzimática (Figura 8-B). A aplicação de fungicida sem a combinação de Ni (controle) apresentou aumento na atividade da SOD, sendo está a maior atividade para os

tratamentos com fungicida. Porém a associação do fungicida com o Ni fez com a atividade da SOD fosse reduzida progressivamente com o aumento das doses de Ni, apresentando valores inferiores aos apresentados pelos tratamentos em que o Ni foi aplicado isoladamente a partir de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni.

Dependendo da concentração, o Ni tanto pode estimular quanto inibir a atividade de enzimas nos tecidos das plantas. Plantas de cevada cultivadas em solução nutritiva contendo 200 e 400 µM de Ni apresentaram aumento na atividade foliar de SOD e CAT para a dose 200 µM de Ni, já quando expostas a 400 µM de Ni não houve diferença para a atividade de CAT e a atividade da SOD foi reduzida (KUMAR; SHARMA; KUMAR, 2012).

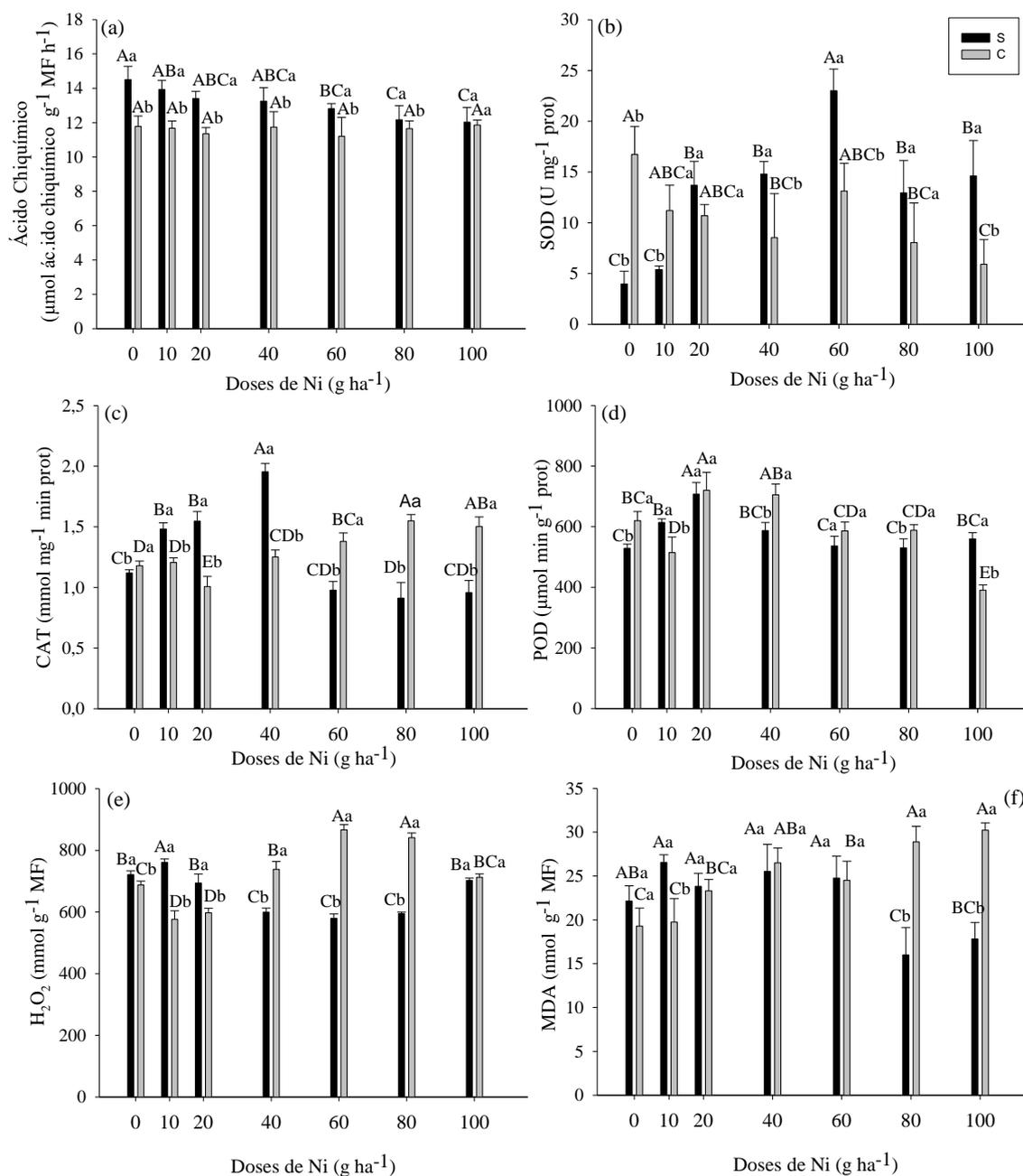
A atividade da CAT aumentou com a aplicação de Ni sem o fungicida nas doses 10, 20 e 40 g ha<sup>-1</sup>, com maior atividade para a última dose, e não apresentou diferença para o tratamento sem Ni para as demais doses, com exceção para a atividade apresentada pela dose 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida que foi inferior ao controle (Figura 8-C). Por outro lado, a aplicação de fungicida apresentou maior atividade de CAT para as doses 0, 60, 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni, quando comparados aos tratamentos sem o produto, apresentando aumento com o aumento das doses de Ni a partir da dose 40 g ha<sup>-1</sup>.

De forma semelhante, a atividade da POD aumentou com a aplicação de 10, 20 e 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida, porém com a maior atividade para a dose 20 g ha<sup>-1</sup>, sendo que para as demais doses não houve diferença estatística com o controle (Figura 8-D). Já quando para os tratamentos com fungicida, quando aplicado sem associação com Ni (controle) houve aumento na atividade da POD, com efeito sinérgico também para as doses 40 e 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni, e efeito antagônico para as doses 10 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni.

Segundo Kazemi et al. (2010) o ferro é componente estrutural de algumas enzimas antioxidantes, entre elas a POD, o que fica demonstrado através da correlação positiva entre a atividade da enzima e o teor foliar de Fe ( $r = 0,292$ ). Embora as doses mais baixas tenham promovido aumento na atividade da POD, apresentou correlação negativa com o teores de Ni foliar ( $r = -0,338$ ) e nos grãos ( $r = -0,297$ ).

Plantas de aguapé cultivadas em solução nutritiva contendo de 1 a 4 mg L<sup>-1</sup> de Ni apresentaram aumento nas atividades de SOD, CAT e POD, sendo que este aumento nas atividades das enzimas antioxidantes foi acompanhado de redução na concentração de MDA (GONZÁLEZ et al., 2015). Por outro lado, cultivando soja em solução nutritiva contendo 2 mM de cloreto de Ni, Sirhindi et al. (2015) verificou aumento nas atividades de SOD e CAT, e redução na atividade de POD, corroborando em partes com o presente trabalho que para as

**Figura 8-** Concentração de ácido chiquímico e atividade de enzimas antioxidativas no tecido foliar de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida. (a) concentração de ácido chiquímico; (b) atividade da superóxido dismutase; (c) atividade da catalase, (d) atividade da peroxidase; (e) peroxidação lipídica e (f) concentração de peróxido de hidrogênio.



Abreviações: S – sem aplicação do fungicida, C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).  
Fonte: Elaboração do próprio autor.

concentrações similares apresentou aumento das atividades de CAT e POD, sendo necessárias doses a partir de 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni para obtenção de maior atividade de SOD. Os autores ainda observaram aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na concentração de MDA.

O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou com a aplicação de 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida, e reduziu com as doses 40, 60 e 80 g ha<sup>-1</sup> de Ni, demonstrando efeito benéfico para essas doses sobre o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tecido foliar (Figura 5-E). Entretanto, quando as mesmas doses foram aplicadas em associação com o fungicida, houve efeito sinérgico entre eles apresentando aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já quando o fungicida foi aplicado sem o Ni, ou com as doses mais baixas 10 e 20 g ha<sup>-1</sup> de Ni, houve efeito benéfico com redução no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A peroxidação lipídica, cujo principal produto é o malondialdeído (MDA), é indicadora efetiva do dano oxidativo sofrido pelas células (CHEN; HUANG; LIU, 2009; GONZÁLEZ et al., 2015). No presente estudo o conteúdo de MDA foi reduzido com a aplicação de 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem fungicida (Figura 8-F). Quando aplicado de forma isolada, ou em combinação com a dose 10 g ha<sup>-1</sup> de Ni, o fungicida exerceu efeito benéfico, reduzindo a concentração de MDA, porém para a combinação com as doses 80 e 100 g ha<sup>-1</sup> de Ni, o fungicida teve efeito contrário apresentando maior conteúdo de MDA.

Cultivando cevada em solução nutritiva contendo 200 e 400 µM de Ni, Kumar, Sharma e Kumar (2012) obtiveram incremento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o aumento na concentração de Ni, porém obtiveram aumento no conteúdo de MDA apenas para a maior dose. Doses excessivas de Ni também causaram aumento nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA em plantas de trigo (PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992; HAO; WANG; CHEN, 2006), milho (BACCOUCH; CHAOUI; FERJANI, 1998), soja (STEBBINS; POLACCO, 1995), colza (KAZEMI et al., 2010) e feijão guandu (RAO; SRESTY, 2000).

A concentração de MDA teve correlação positiva com o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (r = 0,39) e com a atividade de CAT (r = 0,56), e correlação negativa com a SOD (r = - 0,31). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve correlação positiva com o teor de proteína solúvel (r = 0,45), com a atividade de CAT (r = 0,30) e com o NDVI avaliado em 04 de março (r = 0,28), e correlação negativa com a atividade da SOD (r = - 0,43), com a porcentagem de severidade da ferrugem avaliada em R 5.5 (r = - 0,32) e com o teor foliar de N (r = - 0,27).

A capacidade de manutenção das atividades de CAT e SOD em níveis elevados, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do ambiente intracelular (ZHANG; KIRKHAM, 1996). A SOD é responsável por dismutar o superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em formas menos tóxicas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> que consiste no primeiro passo para desintoxicação da

planta. Em seguida CAT e POD são responsáveis por transformar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (THAKUR; SOHAL, 2013).

O declínio na atividade da CAT pode ser atribuído a uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio, que tem seu ligante ao grupo heme inativado (WILLEKENS et al., 1997). Cakmak e Horst (1991) sugerem que a redução da atividade da CAT e o aumento nas atividades da peroxidase em plantas mantidas sob condições de estresse, indicam que o  $H_2O_2$  gerado é mais consumido em processos oxidativos como na peroxidação de lipídios.

Diferentes da maioria dos trabalhos da literatura, o presente trabalho não foi realizado em solução nutritiva, de forma que as plantas não ficaram por longos períodos expostas aos tratamentos com Ni e já estavam bem desenvolvidas quando o mesmo foi aplicado, dessa maneira, mesmo aplicando Ni em concentrações superiores, essas não foram tóxicas para as atividades das enzimas antioxidantes.

Quanto as repostas ao fungicida, o efeito de estrobilurinas e triazois sobre a tolerância ao estresse oxidativo são bem conhecidas. Rodrigues (2009) aplicando a mistura de piraclostrobina + epoxiconazol observou aumento nas atividades enzimáticas de SOD, CAT e POD em dois cultivares de soja. Enquanto que Carrijo (2014) verificou redução na atividade de SOD e CAT para a aplicação de fluxapirroxade isolado e em mistura com piraclostrobina, porém verificou aumento na atividade dessas enzimas quando aplicou piraclostrobina isoladamente. Lacerda (2014) testando diversos fungicidas no tratamento de sementes observou que a mistura fipronil + piraclostrobina + tiofanato metílico promoveram aumento na atividade da CAT, porém este foi acompanhado de aumento na concentrações de  $H_2O_2$  e MDA, quando comparados ao controle sem fungicida.

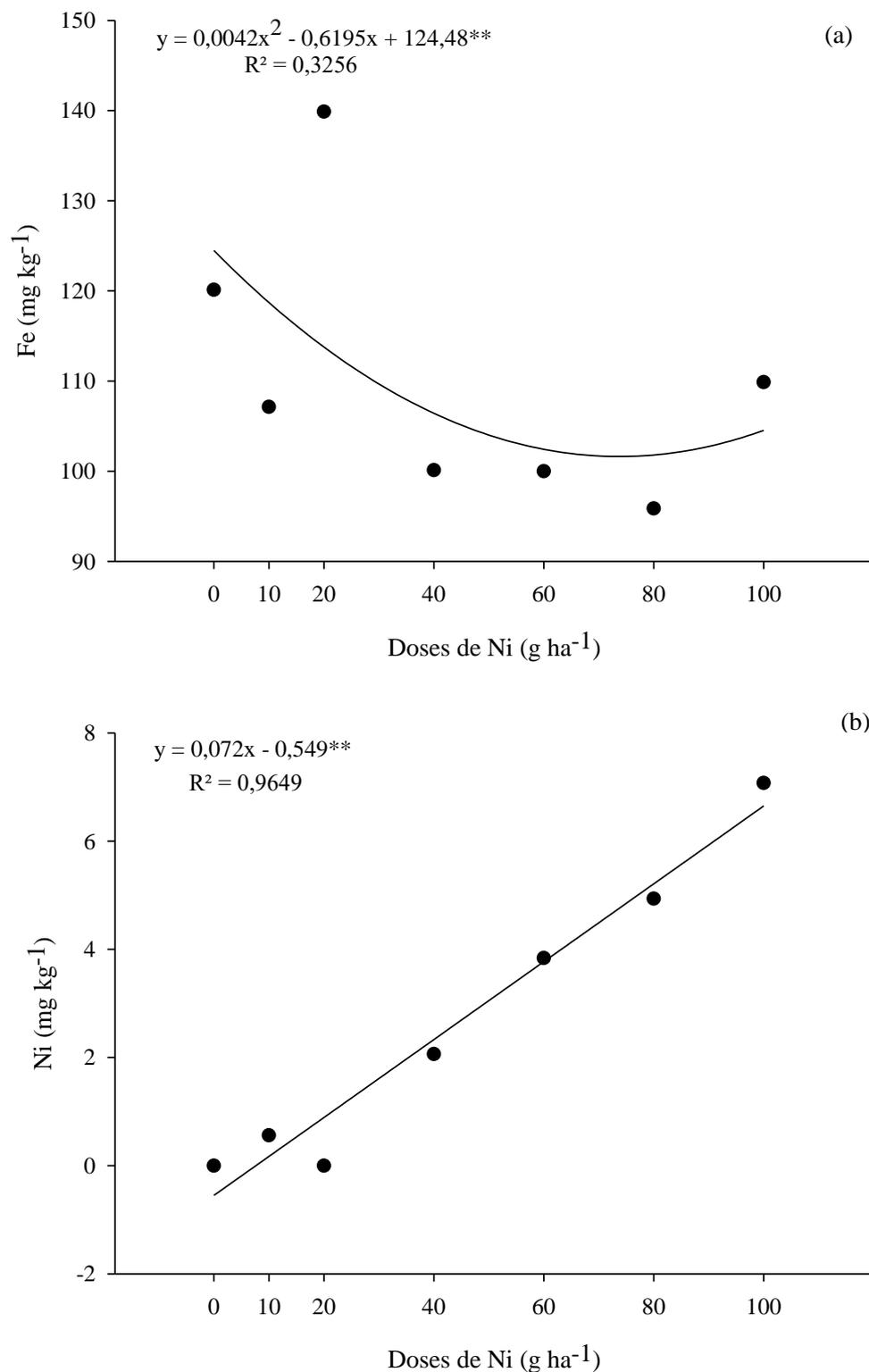
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

A aplicação foliar de Ni apresentou efeito quadrático sobre o teor foliar de Fe, com menor valor para a dose  $73,75 \text{ g ha}^{-1}$  de Ni, não havendo efeito para a aplicação de fungicida. A redução no teor foliar de Fe decorrente da aplicação de Ni também foi observada em plantas de soja (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1978) e cevada (RAHMAN, 2005).

Ainda não é conhecido nenhum transportador específico para o íon Ni (LI et al., 2001; REIS et al., 2014), de forma que o metal então utiliza transportadores de cátions como YSL, ZIP/Nramp e nicotianamina sintase, dessa forma, causando competição entre os cátions divalentes, com destaque para Cu, Fe, Mn e Zn (DOUCHKOV et al., 2005; MIZUNO et al., 2005; GENDRE et al., 2006; WHITE, 2012).

Em estudos realizados com *Arabidopsis thaliana*, Nishida et al. (2015) observaram que o excesso de Ni é absorvido pelo sistema de absorção de Fe e está associada ao gene regulador de transporte de ferro 1 (IRT1- Iron-regulated transporter 1). Em estudos anteriores Nishida et al. (2012), observaram que o excesso de acúmulo de Ni induziu a expressão do gene IRT1, causando uma desordem da homeostase de Fe, sugerindo que o excesso de Ni acelera ainda mais o seu acúmulo por IRT1.

O teor foliar de Ni aumentou de forma linear em função da aplicação de doses crescentes de Ni, sem efeito significativo do fungicida (Figura 9-B). Efeito semelhante foi obtido para o teor de Ni nos grãos, que também aumentou linearmente em função das doses de Ni (Figura 10-C). Esses resultados corroboram com outros trabalhos em que foi observado aumento da concentração de Ni nas folhas e grãos de plantas de soja tratadas com Ni (ALOVISI et al. 2011; KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2012; KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2013b; RODAK, 2014; LAVRES; FRANCO; DE SOUSA CÂMARA, 2016).

**Figura 9-** Teores foliares de ferro (a) e níquel (b) em função da aplicação de Ni

Legenda:<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de  $p < 0,01$  pelo Teste de F.  
 Fonte: Elaboração do próprio autor.

As concentrações de Ni nas folhas de variaram de 0 a 7,0 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 9-B). Concentrações foliares semelhantes também foram obtidas por Alovisei et al. (2011) e por Kutman, Kutman e Cakmak (2013b), estando dentro dos teores considerados normais que variam de 0 a 10 mg kg<sup>-1</sup> de Ni (GERENDÁS et al., 1999). Apesar das altas concentrações obtidas as folhas não apresentaram sintomas de toxidez, diferente do que foi observado com concentrações foliares de 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de Ni por Rodak (2014).

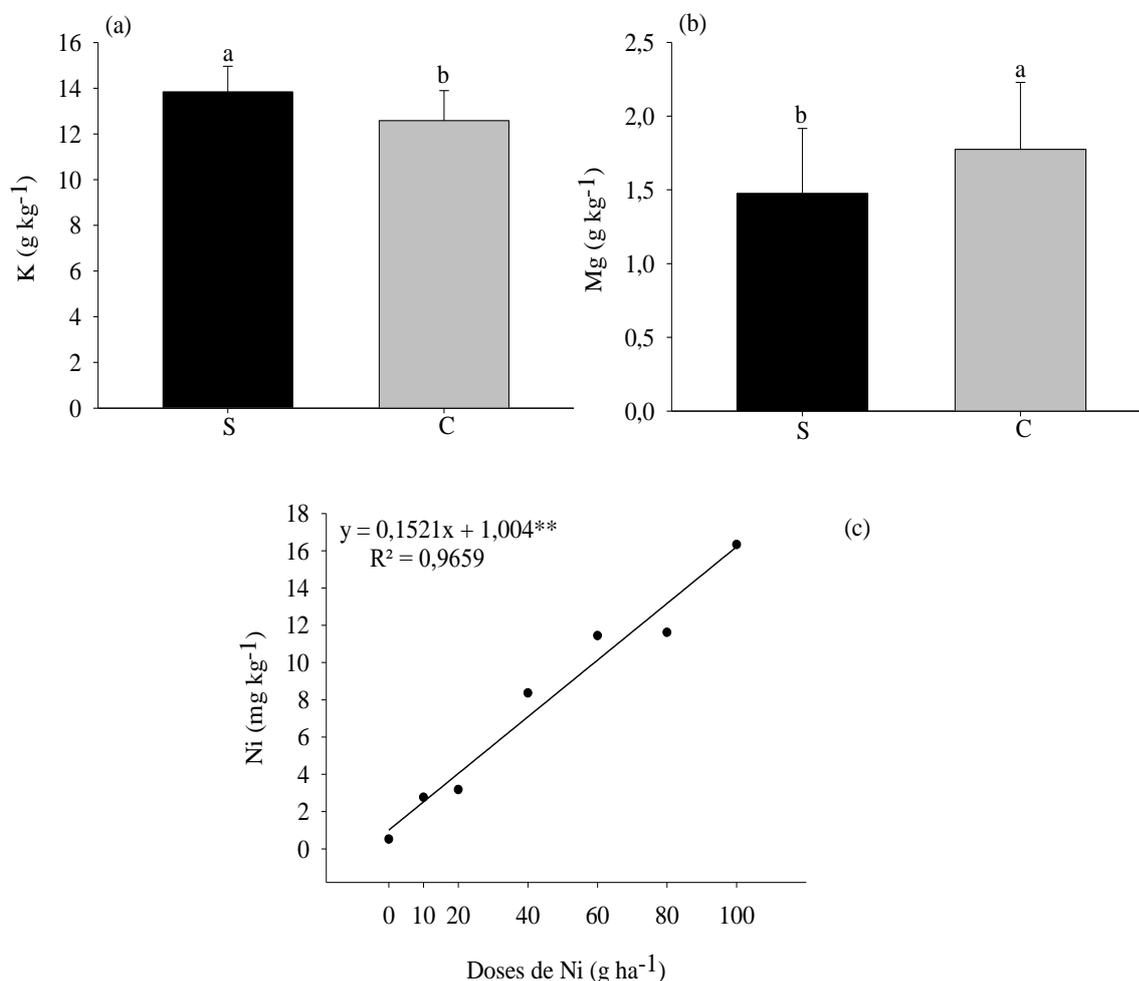
Os teores de Ni nos grãos variaram de 0,51 a 16,33 mg kg<sup>-1</sup>, e foram superiores aos observados por outro autores que obtiveram concentrações entre 0,39 e 13,56 mg kg<sup>-1</sup> (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; RODAK, 2014; LAVRES; FRANCO; DE SOUSA CÂMARA, 2016).

Cataldo, Garland e Wildung (1978) constataram que a partir do início da senescência aproximadamente 70% do Ni é translocado das folhas para os grãos plantas de soja, demonstrando a alta mobilidade do Ni no floema. Em estudo de correlação de Pearson o teor de Ni nos grãos apresentou correlação positiva com o teor foliar de Ni ( $r = 0,530$ ), e correlação negativa com os teores foliares P ( $r = -0,329$ ) e de Ca ( $r = -0,237$ ) (Tabela 2).

Para os teores de K e Mg nos grãos houve efeito significativo apenas do fungicida (Figuras 10-A e 10-B), sendo que enquanto o teor de K reduziu na presença do fungicida (Figura 10-A), o teor de Mg aumentou (Figura 10-B). Estudos sobre o efeito de fungicidas sobre o teor de nutrientes das plantas abordam apenas sua influência sobre o teor de N, e de maneira geral são bastante escassos.

O teor de K nos grãos apresentou correlação negativa com os teores de Ca ( $r = -0,395$ ), Mg ( $r = -0,612$ ), S ( $r = -0,310$ ) e B ( $r = -0,316$ ) nos grãos, e com o teor foliar de K ( $r = -0,293$ ). Já o teor de Mg nos grãos apresentou correlação positiva com os teores de Mn ( $r = 0,388$ ) e B ( $r = 0,316$ ) nos grãos, e com o teor foliar de Zn ( $r = 0,276$ ), e correlação negativa com o teor de Cu nos grãos ( $r = -0,292$ ) (Tabela 2).

**Figura 10-** Teores de nutrientes (a) potássio; (b) magnésio; (c) níquel em grãos de soja em resposta a aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem fungicida, C – com fungicida. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não são significativamente diferentes e acordo com teste t ( $p \leq 0,05$ ) na sequência de uma comparação horizontal de barras a partir de diferentes doses de Ni. (<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de  $p < 0,01$  pelo Teste de F). As barras de erro representam o erro padrão da média ( $n = 4$ ).

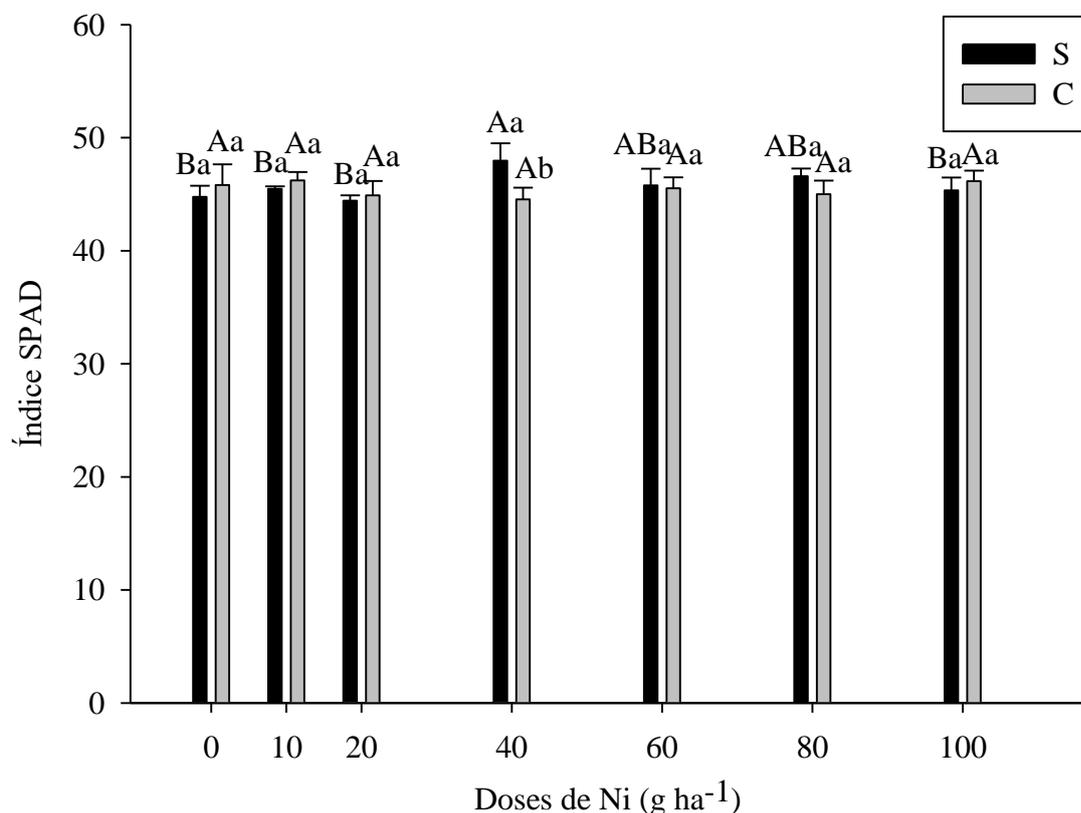
Fonte: Elaboração do próprio autor.

## 5.5 ÍNDICE DE CLOROFILA

O índice SPAD é uma medida indireta da concentração de clorofila nas folhas. Kutman, Kutman, e Cakmak (2013b) observaram maiores valores de índice SPAD em soja para plantas com maior reserva de Ni nas sementes e também em resposta a com a aplicação foliar de Ni. Também trabalhando com soja, Lavres, Franco e Sousa Câmara (2016) obtiveram efeito quadrático ao testar doses crescentes de Ni aplicadas em tratamento de sementes e Rodak (2014) observou aumento no conteúdo de clorofila com a aplicação de Ni via solo. No presente trabalho o índice SPAD não apresentou diferença sob os tratamentos de doses de Ni

com ou sem fungicida, com exceção para a aplicação de 40 g ha<sup>-1</sup> de Ni sem o fungicida que foi superior aos demais (Figura 11).

**Figura 11-** Índice SPAD em folhas de soja em função da aplicação de Ni associado ou não ao fungicida.



Legenda: S – sem aplicação do fungicida, e C – com aplicação do fungicida. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando a aplicação de fungicida e maiúscula comparando as doses de Ni, não diferem entre si estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 4 repetições ( $n = 4$ ).

Fonte: Elaboração do próprio autor.

O índice SPAD apresentou correlação positiva com os teores foliares de Ca ( $r = 0,349$ ), Mg ( $r = 0,263$ ) e Zn ( $r = 0,313$ ), e correlação negativa com a atividade da POD ( $r = - 0,348$ ), com o teor de N nos grãos ( $r = - 0,418$ ), teor de P nos grãos ( $r = - 0,369$ ), teor de S nos grãos ( $r = - 0,342$ ) e teor de Cu nos grãos ( $r = - 0,347$ ) (Tabela 2).

### Parâmetros de produtividade

Não houve efeito significativo das doses de Ni sobre os parâmetros de produtividade, corroborando com os resultados apresentados por (ALOVISI et al., 2011; KUTMAN;

KUTMAN; ÇAKMAK, 2012; RODAK, 2014). Também não houve efeito significativo da aplicação do fungicida sobre os parâmetro de produtividade, demonstrando que mesmo o produto não foi eficiente no controle da ferrugem.

A ferrugem asiática é considerada a doença mais severa na cultura da soja, podendo levar a perdas de 90% de produtividade (GODOY et al., 2015; LANGENBACH et al., 2016). Para os ensaios cooperativos da safra 2014/2015, a aplicação de 3 doses de picoxistrobina + ciproconazol resultou em redução de 20% da produtividade (GODOY et al., 2015). Enquanto a produtividade média brasileira foi de 2882 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2016), a produtividade média obtida no presente trabalho foi de 1890 kg ha<sup>-1</sup>, apresentando uma redução de 34% de produtividade com relação à média brasileira. Quando comparado a produtividade do presente trabalho à produtividade obtida por Godoy et al. (2015) para o produto com melhor desempenho no controle da ferrugem para a safra 2014/2015, que foi de 3448 kg ha<sup>-1</sup>, a perda de produtividade do presente trabalho chega a 45%.

O peso de 100 sementes teve correlação positiva com a produtividade ( $r = 0,45$ ), e correlação negativa com os teores de Mg ( $r = - 0,31$ ), Mn ( $r = - 0,32$ ), Zn ( $r = - 0,30$ ) e B ( $r = - 0,34$ ) nos grãos, e com os teores foliares de Ca ( $r = - 0,27$ ), Mg ( $r = - 0,34$ ) e teor foliar de Ni ( $r = - 0,38$ ), demonstrando que o aumento nas doses de Ni teve efeito negativo na massa dos grãos de soja (Tabela 2).

A produtividade teve correlação negativa com a porcentagem de severidade avaliada em R5.4 ( $r = - 0,27$ ), demonstrando que os tratamentos não foram eficientes em impedir que a doença afetasse a produtividade. A produtividade também teve correlação negativa com o teor de Mn nos grãos ( $r = - 0,37$ ) e com o teor foliar de Zn ( $r = - 0,32$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2-** Correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados nesse estudo.

	Urease	Ureia	SPAD	Ac.chiq.	100 sem	prod.	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	prot	CAT	POD	SOD	% sev1	% Sev2	NDVI1	NDVI2	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ni	
Urease	1																												
Ureia	-0.44	1																											
SPAD			1																										
Ac.chiq.				1																									
100 sem					1																								
prod.					0.45	1																							
MDA		0.44					1																						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		0.44					0.388	1																					
prot		0.44		0.35				0.46	1																				
CAT		0.3						0.562	0.31	0.28	1																		
POD	0.33	-0.433	-0.348									1																	
SOD		-0.552						-0.311	-0.428	-0.61			1																
% sev1						-0.27								1															
% Sev2				0.61				-0.315						0.34	1														
NDVI1				-0.52				0.28						-0.51	-0.75	1													
NDVI2				-0.46										-0.52	-0.71	0.96	1												
N								-0.266										1											
P		0.31							0.27																				
K				-0.31																									
Ca			0.35		-0.27																								
Mg			0.26		-0.34																								
S																													
Cu																						0.53							
Fe																						0.26	0.58	0.51					
Mn											0.292																		
Zn			0.31			-0.32																							
B																													
Ni				-0.28	-0.38				-0.34	-0.338																			

Legenda: Ac. chiq. - ácido chiquímico, 100 sem. - massa de 100 sementes, prod. - produtividade, MDA - concetração de malondialdeído, H2O2 - concentração de peróxido de hidrogênio, prot - proteína, CAT - catalase, POD - peroxidase, SOD - superóxido dismutase, %sev1 - primeira avaliação da severidade, %sev2 - segunda avaliação da severidade.

Fonte: Elaboração do próprio autor

## 6 CONCLUSÃO

A aplicação de Ni é eficiente no controle 'in vitro' da germinação de esporos de ferrugem.

Em condições de campo, o Ni não é eficiente no controle da severidade da ferrugem asiática e também não apresenta diferenças de produtividade.

O fungicida apresenta eficiência no controle da severidade da ferrugem asiática nas duas avaliações de severidade, porém não apresenta diferenças entre a testemunha e os tratamentos com Ni para os parâmetros de produtividade.

A aplicação de 40 g ha<sup>-1</sup> Ni sem fungicida aumenta o teor de clorofila das folhas.

A aplicação de doses de Ni sem o fungicida aumenta a atividade das enzimas antioxidantes. Quando associado ao fungicida porém as doses mais altas são tóxicas reduzindo a atividade das enzimas antioxidantes e aumentando os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de MDA.

## REFERÊNCIAS

- ALCARDE, J. C. A determinação do boro em plantas pelo método colorimétrico da curcumina. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 31-41, 1969.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 24, n. 12, p.1337-1344, 2001.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2014.
- ARKOUN, M.; JANNIN, L.; LAÎNÉ, P.; ETIENNE, P.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CITERNE, S.; GARNICA, M.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; OURRY, A. A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, Netherlands, v. 362, n.1, p. 79-92, 2013.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of plant nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, 2001.
- BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, New York, v. 140, n. 2, p. 433-443, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, n. 1, p. 2, 1976.
- BRADLEY, C. A. Fungicide resistance management in soybean. In: DORRANCE, A. E.; DRAPER, M. A.; HERSHMAN, D. E. **Using foliar fungicides to manage soybean rust**. Washington: National Agricultural Library, 2007. 57–60 p.
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p. 801-803, 1987.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.
- CATALDO, D. A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. **Plant Physiology**, New York, v. 62, n. 4, p. 5636–5665, 1978.

CARRIJO, D. R. **Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapirroxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo\_ USP, Piracicaba, 2014.

CHEN, C.; HUANG, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. **Clean-soil, air, water**, Malden, v. 37, n. 4-5, p. 304-313, 2009.

CIURLI, S. Electronic structure of the nickel ions in the active site of urease. **Chemistry**, Easton, v. 2001, n. 1, p. 99-100, 2001.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate: a literatura analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 48-74.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2015/16**, n. 9 - nono levantamento, junho 2016. Brasília: Conab, 2016. v. 2, n. 9, p. 1-174. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_06\\_09\\_16\\_49\\_15\\_boletim\\_graos\\_junho\\_\\_2016\\_-\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf)>. Acesso em: 30 jun 2016

DAS, P. K.; KAR, M.; MISHRA, D. Nickel nutrition of plants: effect of nickel on some oxidase activities during rice (*Oryza sativa* L.) seed germination, **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 225-233, 1978.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme: simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, Columbus, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, 1975.

DOUCHKOV, D.; GRYCZKA, C.; STEPHAN, U. W.; HELL, R.; BÄUMLEIN, H. Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 28, n. 3, p. 365-374, 2005.

EL SHORA, H. M.; ALI, A. S. Plant growth regulators induced urease activity in *Cucurbita pepo* L. cotyledons. **Acta Biologica Hungarica**, Tihany, v. 67, n. 1, p. 53-63, 2016.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher-plants. **Science**, Washington, v. 222, n. 4624, p. 621-623, 1983.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. **Plant Physiology**, New York, v. 3, n. 76, p. 691-693, 1984.

FABIANO, C. C.; TEZOTTO, T.; FAVARIN J. L.; POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P. Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 6, n. 754, p. 1-4, 2015.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - FRAC. **PHAKPA in vitro method syngenta**. Basel: Crop Life International, 2006. v. 1. Disponível em: <<http://www.frac.info/monitoring-method>>. Acesso: 5 abr. 2016.

- GAD, N.; EL-SHERIF, M. H.; EL-GEREEDLY, N. H. M. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Pakistan, v. 3, n. 1, p. 286-293, 2007
- GENDRE, D.; CZERNIC, P.; CONÉJÉRO, G.; PIANELLI, K.; BRIAT, J. F.; LEBRUN, M.; MARI, S. TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. **The Plant Journal**, Malden, v. 49, n. 1, p. 1-15, 2007.
- GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. **Plant and Soil**, Netherland, v. 190, n. 1, p. 153-162, 1997
- GERENDÁS, J.; ZHU, Z., SATTELMACHER, B. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 326. p. 1545-1554, 1998.
- GERENDÁS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K.; SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Landau, v. 162, n. 3, p. 241-256, 1999.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, New York, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic Scale for Assessment of Soybean Rust Severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 63 - 68, 2006.
- GODOY, C. V.; DEHNE, H. W.; DEISING, H. B.; GISI, U.; KUCK, K. H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. *Phakopsora pachyrhizi*: the performance of soybean rust fungicides over years and regions in Brazil. In: MODERN FUNGICIDES AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN SYMPOSIUM, 6., Friedrichroda, 2010. **Proceedings ...** Friedrichroda: Deutsche Phytomedizinische, 2011. p. 203-209.
- GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; ROESE, A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. N. P. de; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 7 p. (Circular técnica, 99).
- GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; ITO, M. F.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. N. P. de; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora***

***pachyrhizi*, na safra 2013/14:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 7 p. (Circular técnica, 103).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; MADALOSSO, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas multissítios e fertilizantes no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015a. 7 p. (Circular técnica, 113).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSSO, M.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015b. 6 p. (Circular técnica, 111).

GODOY, C. V.; BUENO, A. F.; GAZZIERO, D. L. P. Brazilian Soybean Pest Management and Threats to its Sustainability. **Outlooks on Pest Management**, Buckinghamshire, v. 26, n. 3, p. 113-117, 2015.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500002

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 5, p. 420-429, 2006.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GONZÁLEZ, C. I.; MAINE, M. A.; CAZENAVE, J.; HADAD, H. R.; BENAVIDES, M. P. Ni accumulation and its effects on physiological and biochemical parameters of *Eichhornia crassipes*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 20-27, 2015.

GRAHAM, R. D.; WELCH, R. M.; WALKER, C. D. A role for nickel in the resistance of plants to rust. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE, 3., 1985, Hobart. **Proceedings...** Hobart: Australian Society of Agronomy, 1985. 337 p.

HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (Ed.). **Compendium of**

**soybean diseases and pests**. 5th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2015. p. 56-58.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, Netherland, v. 125, n. 1, p. 2141-2145, 1968.

HIKISHIMA, M.; CANTERI, M. G.; GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; DA SILVA, A. J. Quantificação de danos e relações entre severidade, medidas de refletância e produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, v. 35, n. 2, p. 96-103, 2010.

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p.663-667, 1983.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles: University of California, 1959. v.766, n. 1, p. 32-33.

KAZEMI, N.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; FAHIMI, H.; SAADATMAND, S.; NEJAD-SATTARI, T. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 126, n. 3, p. 402-407, 2010.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; RAO, J. N. Control of foliar diseases of groundnut using inorganic and metal salts. **International Arachis Newsletter**, Patancheru, v. 21, n. 1, p. 33-35, 2001.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A., EVANS, H. J. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 8, n. 80, p. 2253-2257, 1983.

KOJIMA, S.; BOHNER, A.; GASSERT, B.; YUAN, L.; VON WIREN, N. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **The Plant Journal**, Malden, v. 52, n. 1, p. 30-40, 2007.

KROGMEIER, M. J.; McCARTY, G. W.; SHOGREN, D. R.; BREMNER, J. M. Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar-applied urea. **Plant and Soil**, Netherland, v. 135, n. 2, p. 283-286, 1991.

KUMAR, H.; SHARMA, D.; KUMAR, V. Nickel-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in barley roots and leaves. **International Journal of Environment Biology**, Lucknow, v. 2, n. 3, p. 121-128, 2012.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 1007, n. 1-2, p.115, 2012.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Effects of seed nickel reserves or

externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate fed soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 376, n. 1-2, p. 261-276, 2013a.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Foliar nickel application alleviates detrimental effects of glyphosate drift on yield and seed quality of wheat. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 61, n. 35, p. 8364-8372, 2013b.

LACERDA, M. P. **Caracterização fisiológica de plântulas de soja submetidas a diferentes tratamentos químicos**. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2014.

LANGENBACH, C.; CAMPE, R.; BEYER, S. F.; MÜLLER, A. N.; CONRATH, U. Fighting Asian soybean rust. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 797, 2016.

LAVRES, J.; FRANCO, G. C.; DE SOUSA CÂMARA, G. M. Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 4, n. 1, p. 37, 2016.

LIMA, G. P. P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. 1994. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, 1994.

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

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica química acta**, Netherland, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MIZUNO, T.; USUI, K.; HORIE, K.; NOSAKA, S.; MIZUNO, N.; OBATA, H. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, n. 8, p. 793-801, 2005.

MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolism. **The Botanical Review**, New York, v. 40, n. 4, p. 395-452, 1974.

NISHIDA, S.; AISU, A.; MIZUNO, T. Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. **Plant signaling & behavior**, Behav, v. 7, n. 3, p. 329–331. 2012.

NISHIDA, S.; KATO, A.; TSUZUKI, C.; YOSHIDA, J.; MIZUNO, T. Induction of nickel accumulation in response to zinc deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 16, n. 5, p. 9420-9430, 2015.

OLIVEIRA, T. C.; FONTES, R. L. F.; REZENDE, S. T. D.; HUGO, V.; ALVAREZ, V. Effects of nickel and nitrogen soil fertilization on lettuce growth and urease activity. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 698-706, 2013.

PANDEY, N.; SHARMA, C. P. Effect of heavy metals Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, Netherland, v. 163, n. 4, p. 753-758, 2002.

- PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 15, n. 6, p. 719-725, 1992.
- POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **International review of cytology**, Netherland, v. 145, n. 1, p. 56-103, 1993.
- POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion–nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant science**, Netherland, v. 199, n. 1, p. 79-90, 2013.
- QUEIROZ, C. S. **Níquel, outros micronutrientes e silício e a ferrugem asiática (*Phakopsora Pachyrhizi*) na cultura da soja (*Glycine Max*)**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 200. , 285 p.
- RAHMAN, H.; SABREEN, S.; ALAM, S.; KAWAI, S. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 393-404, 2005.
- RAO, K. V. M.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant science**, Netherland, v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.
- REILLEY, C.; CRAWFORD, M.; BUCK, J. Nickel suppresses daylily rust, *Puccinia hemerocallidis* on susceptible daylilys, *Hemerocallis* in greenhouse and field trials. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. S88-S88, 2005.
- REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, v. 1, n. 147, p. 10-24. 2014.
- RITCHIE, S.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. **How a Soybean Plant Develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1997. (Special Report, 53)
- RODAK, B. W. **Níquel em solos e na cultura de soja**. 2014. 101f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Paraná- UFPR, Curitiba, 2014.
- RODRIGUES, M.A.T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2009.
- SCALABRIN, E.; RADAELLI, M.; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 103, n. 1, p. 53-60, 2016.

- SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B., Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 4, p. 523–544. 2001.
- SILVA, A. C. D.; SOUZA, P. E. D.; AMARAL, D. C.; ZEVIANI, W. M.; PINTO, J. E. B. P. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of asian soybean rust. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringa, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2014.
- SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, n. 1, p. 527-530, 1998.
- SIRHINDI, G.; MIR, M. A.; SHARMA, P.; GILL, S. S.; KAUR, H.; MUSHTAQ, R. Modulatory role of jasmonic acid on photosynthetic pigments, antioxidants and stress markers of *Glycine max* L. under nickel stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 21, n. 4, p. 559-565, 2015.
- SHIMADA, N.; ANDO, T. Role of nickel in plant nutrition II. Effect of nickel on assimilation of urea by plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Hokkaido, v. 51, n. 1, p. 493-496, 1980.
- SOIL SURVEY STAFF. **Soil taxonomy**: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2. ed. United States: Department of Agriculture, 1999. 436 p.
- STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. **Plant Physiology**, New York, v. 109, n. 1, p. 169-175, 1995.
- TAN, X.W.; IKEDA, H.; ODA, M. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. **Scientia Horticulturae**, Netherland, v. 84, n. 3, p. 265-273, 2000.
- THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN biochemistry**, Cairo, v. 2013 n.1, p. 1-10., 2013.
- WALKER, C.D.; GRAHAM, R.D.; MADISON, J.T.; CARY, E.E.; WELCH, R.M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, New York, v. 79, n. 2, p. 474-479, 1985.
- WANG, H.; CAO, C.; KANG, J.; ZENG, F. Resistance to bacterial blight induced by nickel nitrate in rice seedlings. **Journal of Hunan Agricultural University**, Hunan, v. 26, n. 2, p. 119-121, 1999.
- WHITE, P. J. Long-distance transport in the xylem and phloem. In: MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3rd ed. London: Academic Press, 2012. 49-70 p.
- WIEBKE-STROHM, B.; PASQUALI, G.; MARGIS-PINHEIRO, M.; BENCKE, M. ; BÜCKER-NETO, L. B.; BECKER-RITT, A.; MARTINELLI, A. H. S.; RECHENMACHER,

C.; POLACCO, J. C.; STOLF, R.; MARCELINO, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; HOMRICH, M. S.; DEL PONTE, E. M.; CARLINI, C. R.; CARVALHO, M. C. C. G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. **Plant molecular biology**, Netherland, v. 79, n. 1-2, p. 75-87, 2012.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO journal**, Malden, v. 16, n. 16, p. 4806-4816, 1997.

WOOD, B. W.; REILLY, C. C. Nickel and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 2007. p. 215-231.

WOOD, B.; REILLY, C.; BOCK, C.; HOTCHKISS, M. Suppression of Pecan Scab by Nickel. **HortScience**, Netherland, v. 47, n. 4, p. 503-508, 2011.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 149, n. 5, p. 489-493, 1996.

ZOBIOLE, L. H. S.; DE OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; HUBER, D. M.; CONSTANTIN, J.; DE CASTRO, C.; DE OLIVEIRA, F. A.; DE OLIVEIRA JR, A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant and Soil**, Netherland, v. 328, n. 1-2, p. 57-69, 2010.