Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Resposta do tomateiro à aplicação de L-arginina em plantas cultivadas em
ambiente protegido

Fábio Keiti Nakagawa

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

Fábio Keiti Nakagawa
Engenheiro Agrônomo

Resposta do tomateiro à aplicação de L-arginina em plantas cultivadas em ambiente protegido

Orientador:
Prof^a. Dr^a. **SIMONE DA COSTA MELLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Nakagawa, Fábio Keiti

Resposta do tomateiro à aplicação de L-arginina em plantas cultivadas em ambiente protegido / Fábio Keiti Nakagawa. - - Piracicaba, 2017.

40 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Solanum lycopersicum* 2. Aminoácido 3. Estresse abiótico 4. Enzimas antioxidantes I. Título

Dedico

A toda a minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder a vida, e me dar forças em todos os momentos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade da realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em especial a secretária Luciane Toledo pela amizade e suporte.

À professora Simone da Costa Mello, pela orientação, confiança e amizade durante todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de produção vegetal, Paulo, Célia, Elisabete, Horst, Cido, Gérson, Nivaldo, Gaudêncio, Osmair pela colaboração.

À Camila Gabriela de Souza e Débora Schiavon Dalbon pela ajuda imprescindível na condução e avaliação do experimento.

Aos colegas da Fitotecnia, Rachel Tonhati, Adriano Dantas, Leonardo Perez e Gustavo Quesada Roldán (o costarriquenho mais brasileiro que conheço) pela amizade e colaboração.

Aos amigos que fiz no departamento de Fitopatologia, Rafael, Meyriele, Josi, Kelly, Ricardo, André, Bárbara, Antônio, Juliana, Juan, Silvia e Ortiz pela juventude e confraternizações.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos e Práticas em Olericultura (GEPOL), que direta ou indiretamente ajudaram na condução do experimento.

Aos meus amigos, Renan Fernandes Alves, Aline Cristina Fermino, Adriano Gazzola, Thiago de Paula Oliveira, Letícia Lara, pela amizade em todos os momentos.

À Isabela V. Primiano, minha namorada, pela paciência, amizade e carinho em todos os momentos.

À empresa Ajinomoto do Brasil, através dos funcionários Camila Siviero Pagani, Fernando Santos Theodoro e Fabio Kooiti Siguematu por fornecer o apoio técnico e financeiro sem o qual não seria possível realizar esta pesquisa.

As alunas de pós-graduação do laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, Márcia, Berenice, Kamila, Fabiana, Mônica, pelo apoio e ensinamentos.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes Azevedo pelos ensinamentos e por permitir a utilização do laboratório.

A Dr^a Salete Aparecida Gaziola pela amizade, paciência e disposição em ajudar nas análises bioquímicas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que por ventura não mencionei, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Localização e características da área experimental	11
2.2. Tratamentos e delineamento experimental	11
2.3. Características do cultivar	11
2.4. Produção de mudas e condução das plantas	11
2.5. Manejo da fertirrigação.....	12
2.6. Aplicação foliar de L-arginina	14
2.7. Características avaliadas.....	14
2.7.1. Caracterização do ambiente de cultivo.....	14
2.7.2. Coleta de amostras para análises enzimáticas e quantificação de aminoácidos livres	14
2.7.2.1. Peroxidação lipídica.....	14
2.7.2.2. Peróxido de hidrogênio	15
2.7.2.3. Extração e quantificação de proteínas solúveis	15
2.7.2.3.1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	15
2.7.2.3.2. Atividade da enzima catalase (CAT)	16
2.7.2.3.3. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX).....	16
2.7.2.4. Teor de aminoácidos livres nas folhas.....	16
2.7.3. Teor de nutrientes nas folhas.....	16
2.7.4. Produção.....	16
2.7.5. Qualidade	17
2.8. Análise estatística	17
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Caracterização do microclima da casa-de-vegetação.	19
3.2. Indicadoras de estresse e enzimas antioxidantes	20
3.3. Teor de aminoácidos livres nas folhas.....	21
3.4. Teor de nutrientes nas folhas.....	22

3.5. Produção e qualidade	23
4. DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
APÊNDICE	35

RESUMO

Resposta do tomateiro à aplicação de L-arginina em plantas cultivadas em ambiente protegido

Uma das alternativas para reduzir os efeitos negativos das altas temperaturas nas plantas e, conseqüentemente a perda na produção e qualidade é a utilização de indutores de tolerância. Dentro deste contexto, a L-arginina, se apresenta como uma alternativa, por ser um dos aminoácidos mais funcionais e precursora de importantes compostos na regulação metabólica das plantas, com efeito na atenuação do estresse abiótico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação foliar de diferentes doses de L-arginina (0; 0,15; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹) na fisiologia, produção e qualidade do tomate cultivar Pizzadoro cultivado em ambiente protegido no período de verão. Para avaliação do efeito da L-arginina na fisiologia, foram feitas análises de indicadores de estresse dos compostos malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), teores de aminoácidos livres e teores de nutrientes nas folhas de tomateiro. Na produção foram determinadas a produção total (PT), a produção com presença de defeitos (PRDEF), a produção não comercial (PRNC) e a produção comercial (PC) com a classificação de calibre pequeno (PROP), médio (PROM) e grande (PROG). Além disso, foram determinados o número de frutos totais (NFT), número de frutos com presença de defeitos (NDEF), número de frutos não comerciais (NFNC) e número de frutos comerciais (NFC) com classificação de calibre pequeno (NFP), médio (NFM) e grande (NFG). Amostras de frutos maduros foram colhidas para a determinação de sólidos solúveis (SST), pH da polpa, ácido ascórbico (AA) e acidez total titulável (ATT) para determinação da qualidade do tomate. A aplicação de 1,0 g L⁻¹ de L-arginina diminuiu o teor de MDA, e aumentou a atividade das enzimas CAT e APX. Além disso, essa dose do aminoácido aumentou a PC, PT, NFC, NFT e diminuiu a produção de NFNC.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*; Aminoácido; Estresse abiótico; Enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Response of tomato to L-arginine application on plants growing in protected environment

Tolerance inductor products are one of the alternatives to reduce the negative effects of abiotic factors in plants, for instance the decrease of crop yield and quality. In this context, L-arginine is one option of this products to mitigate abiotic plant stress, due to its importance as a functional amino acid and precursor of metabolic plant compounds. Hence, the project objective was to evaluate the exogenous foliar application of different rates of L-arginine (0; 0.15; 0.25; 0.5; 1.0 e 2.0 g L⁻¹) on physiology, yield and quality of tomato cultivar Pizzadoro growth in protected environment during Summer. Physiological effect were analyzed by markers of oxidative stress, as malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide; activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes; free amino acids and nutrient contents in tomato leaves. Yield was estimated by total production (TP), production of defective fruit (PDF), non-commercial fruit production (NCFP) and commercial fruit production (CP). CP was classified as small (SPRO), medium (MPRO) and large (LPRO) sizes. Number of total fruit (NTF), number of defective fruit (NDF), number of non-commercial fruit (NNCF) and number of commercial fruit (NCF) were classified as small (NSF), medium (NMF) and large (NLF) sizes. Sample of mature tomatoes were harvested to assess quality, by content of soluble solids (SST), pH of tomato pulp, ascorbic acid (AA) and titratable acidity (TA). Application of L-arginine at rate of 1.0 g L⁻¹ reduced MDA and increased CAT and APX. Besides physiological aspects, this level of amino acid increased CP, TP, NCF, NTF and decreased NNCF.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; Amino acid; Abiotic stress; Antioxidant enzymes

1. INTRODUÇÃO

Inicialmente o cultivo protegido visava o cultivo de hortaliças em época de entressafra, uma vez que sua estrutura permitia a proteção contra agentes meteorológicos como chuva, vento e granizo. Atualmente o cultivo protegido é utilizado para aumentar a produtividade e qualidade, além de permitir a otimização do uso de insumos como fertilizantes e defensivos, e outros recursos naturais como água, assim como estender o ciclo produtivo.

Entretanto, a maior parte das estruturas de cultivo protegido existentes no Brasil não possuem sistemas de climatização, ou de dissipação de calor como ventiladores, lanternim e janelas zenitais para cultivo em épocas e regiões em que ocorrem elevadas temperaturas, elevando a temperatura no ambiente interno, em média, 4° C em relação ao ambiente externo (Costa et al., 2015). Além disso, para controle de pragas, principalmente os vetores de doenças viróticas comuns no cultivo de tomate, é feito a adoção de telados anti-afídeos nas laterais das estruturas, que reduzem a taxa de ventilação em razão da sua resistência à corrente de ar e como consequência, há redução na velocidade dos ventos no interior dos abrigos e aumento do gradiente de temperatura (Furlan & Folegatti, 2002; Teruel, 2010).

Deste modo, provavelmente o fator abiótico que exerce os maiores danos no cultivo protegido de tomate em clima tropical são as altas temperaturas, que provocam várias alterações de ordem fisiológica e metabólica nas plantas, modificando as estruturas de complexos de proteínas do cloroplasto, causando danos e alterando a permeabilidade das membranas celulares, assim como a diferenciação, alongação e expansão celular (Potters et al., 2009; Howarth, 2005). Os danos são causados principalmente pela produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) que ocorre principalmente pelo desbalanço entre reações fotoquímicas e bioquímicas (Wise et al., 2004), diminuindo a fotossíntese, e consequentemente afetando a produção.

Além disso, as altas temperaturas também afetam o florescimento e a frutificação do tomateiro, reconhecidos como as fases mais termosensíveis, e que frequentemente resultam na diminuição da produtividade (Hedhly et al., 2009; Thakur et al., 2010). Em geral, a antese é fase mais sensível as altas temperaturas, sendo que a microsporogênese é afetada em temperaturas ligeiramente acima do ideal (Peet et al., 1998), tanto na produção de pólen como na viabilidade dos mesmos (Pressman et al., 2002; Sato et al., 2000). Na literatura, há relatos que plantas expostas a temperaturas acima de 5 °C das condições ótimas para o crescimento demonstram alterações nas características celulares e metabólicas (Guy, 1999; Frangkostefanakis et al., 2015). Entretanto, cabe ressaltar que além da intensidade, a duração e a variação da temperatura podem causar diferentes impactos no desenvolvimento das plantas (Wahid et al., 2007), promovendo respostas transitórias ou contínuas para proteger as células vegetais do estresse como o aumento de proteínas de choque, enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e compostos não enzimáticos como o ascorbato, glutathione, carotenóides, α -tocoferol e compostos fenólicos para detoxificação. (Mittler et al., 2012).

Uma das alternativas para amenizar os efeitos das altas temperaturas é a utilização de indutores de tolerância, uma vez que não demandam mudanças radicais na estrutura de cultivo ou recursos financeiros exorbitantes. Os principais indutores utilizados são os sais inorgânicos, osmoprotetores, moléculas sinalizadoras, oxidantes, bioestimulantes e moléculas de baixo peso molecular, como os aminoácidos.

Dentre os aminoácidos utilizados, encontra-se a L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidino-pentanóico), um aminoácido polar básico, que é precursor de moléculas mediadoras de processos biológicos e fisiológicos, como as poliaminas, óxido nítrico e prolina, citadas como importantes compostos na sinalização e resposta ao estresse

abiótico (Bouchereau et al., 1999; Galston et al., 1997; Groppa and Benavides, 2008; Hayat et al., 2012; Siddiqui et al., 2011). Apesar dos efeitos deste aminoácido ser amplamente citado, a maior parte das pesquisas está relacionada a sua aplicação em fases específicas das culturas como a germinação e o florescimento, não abrangendo o efeito durante todo o ciclo da cultura, e conseqüentemente há pouca informação do seu efeito sobre a produtividade.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação via foliar de L-arginina na fisiologia, produtividade e qualidade em tomateiro cultivado em ambiente protegido no período de verão na região de Piracicaba-SP

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização e características da área experimental

O experimento foi conduzido no período de 17 de novembro de 2015 a 18 de março de 2016 em casa-de-vegetação localizada no Departamento de Produção Vegetal, pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, no município de Piracicaba (SP). Segundo a classificação climática de Köppen o clima da região é classificado como Cwa, ou seja, subtropical úmido, caracterizado por temperatura média do mês mais quente acima de 22 °C, e do mês mais frio inferior a 18 °C, com três meses mais secos (junho, julho e agosto), com chuvas concentradas no verão, e seca no inverno.

A casa-de-vegetação utilizada foi do tipo arco com 6,40 m de largura e 42 m de comprimento, com altura do pé direito de 3,5 m e coberta com filme de polietileno aditivado (anti-UV) com 150 µm de espessura, as laterais eram cobertas por tela anti-afídeo.

2.2. Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos foram compostos por cinco doses de L-arginina (0,15; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g. L⁻¹) e um controle (água) aplicados por pulverização nas folhas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com três repetições, sendo que cada parcela foi composta por 10 plantas dispostas em linha dupla. A primeira e a última planta de cada linha da parcela foram consideradas bordadura, totalizando seis plantas úteis.

2.3. Características do cultivar

O cultivar utilizado foi o híbrido Pizzadoro®. Pertence ao grupo Italiano com hábito de crescimento indeterminado, que apresenta resistência à *Verticillium dahliae* (raça 1), *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersyci (raças 0,1), *Pseudomonas syringae* pv tomato (Pst), Vírus do Mosaico do fumo (TMV) e resistência aos nematoides *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* (Nunhems, 2016).

2.4. Produção de mudas e condução das plantas

A semeadura de tomate cv. Pizzadoro foi realizada no dia 16 de outubro de 2015, em bandejas plásticas de 128 células preenchidas com substrato de fibra de coco. A produção das mudas foi realizada por um viveiro comercial localizado no município de Mogi-Guaçu-SP. O transplante das mudas ocorreu no dia 17 de novembro (32 dias após a semeadura), quando as mesmas possuíam de três a quatro pares de folhas verdadeiras.

As mudas foram transplantadas em vasos de 8 litros preenchidos com fibra de coco (Tabela 1). O espaçamento utilizado foi de 0,4 m entre plantas, 0,6 m entre linhas e 1,4 m entre linhas duplas (2,5 plantas m⁻²). As plantas de tomate foram conduzidas com uma haste no sentido vertical através de fitilhos plásticos. A extremidade inferior do fitilho foi amarrada na base da planta, e a extremidade superior foi amarrada no arame superior

posicionado a 2,5 m de altura. Semanalmente, à medida que ocorria o desenvolvimento vegetativo das hastes as plantas eram conduzidas no fitilho. Além da condução, semanalmente também foram realizadas a retirada de brotações oriundas das axilas foliares, sendo que após a realização desta prática era feito a aplicação de fungicidas protetores com o intuito de prevenir a entrada de patógenos.

Após o início do florescimento, diariamente, entre 10 e 11 horas da manhã, foi realizada a polinização através da vibração do arame superior, e após a fixação dos frutos foi feito o desbaste dos cachos para a retirada do excesso de frutos mantendo os mesmos com seis frutos. A capação das plantas, ou seja, a retirada da gema apical ocorreu quando elas atingiram o arame superior (2,5 m).

Tabela 1. Análise físico-química do substrato de fibra de coco utilizado no experimento. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

Determinações	Base seca (65 °C)	Base úmida
pH (CaCl ₂ 0,01 M)	-	5,7
Densidade (g cm ⁻³)	-	0,18
Umidade (60 - 65°C) (%)	-	41,45
Umidade 110°C (%)	-	3,30
Matéria Orgânica Total (%)	88,73	51,95
Carbono Orgânico (%)	46,25	27,08
Resíduo Mineral Total (%)	5,64	3,30
Resíduo Mineral (%)	4,97	2,91
Resíduo Mineral Insolúvel (%)	0,67	0,39
Nitrogênio Total (%)	0,68	0,40
Fósforo (P ₂ O ₅) total (%)	0,27	0,16
Potássio (K ₂ O) total (%)	0,97	0,57
Cálcio (Ca) total (%)	2,82	1,65
Magnésio (Mg) total (%)	0,10	0,06
Enxofre (S) total (%)	0,12	0,07
Relação C/N	-	68
Cobre (Cu) (mg kg ⁻¹)	15	9
Manganês (Mn) (mg kg ⁻¹)	51	30
Zinco (Zn) (mg kg ⁻¹)	58	34
Ferro (Fe) (mg kg ⁻¹)	1424	834
Boro (B) (mg kg ⁻¹)	10	6
Sódio (Na) (mg kg ⁻¹)	854	500
CTC (mmol _c kg ⁻¹)	220,00	
CE (mS m ⁻¹)	2,07	

2.5. Manejo da fertirrigação

O sistema de fertirrigação, para aplicação da solução nutritiva foi composto por duas motobombas de 0,5 cv, filtros de disco, regulador de pressão, quatro caixas de 500 L e gotejadores do tipo autocompensantes com vazão

de 8 L h⁻¹ inseridos em tubos de polietileno de 16 mm. Na extremidade superior do gotejo foi utilizado um divisor de quatro saídas, cada uma conectada a um microtubo de 0,7 m de comprimento, sendo que cada vaso possuía dois gotejadores com vazão de 2 L h⁻¹ cada uma.

O controle da frequência da fertirrigação foi feito através de sistema gasoso de controle de irrigação (Irrigas®), acoplado a uma central de medição digital. Neste sistema, as motobombas foram acionadas pela central de medição digital, que estava acoplado aos ramais constituídos por microtúbulos interligados a oito sensores instalados nos vasos, próximas a maior concentração das raízes. Deste modo, a frequência da fertirrigação foi realizada automaticamente, e acionada toda vez que a tensão da água no substrato atingia 4 kPa. A duração de cada evento de irrigação variou conforme o desenvolvimento das plantas, sendo que semanalmente foi realizado o ajuste do tempo de irrigação com o intuito de permitir uma drenagem de aproximadamente 20% do volume aplicado.

Semanalmente foi realizada a análise da condutividade da solução nutritiva drenada dos vasos. Quando o valor da CE ultrapassava 3,6 dS m⁻¹ era realizada a aplicação de água para a lixiviação dos sais, e logo em seguida era realizada a aplicação da solução nutritiva para o retorno do valor da condutividade elétrica na solução do substrato próximo a 1,76 dS m⁻¹ (fase vegetativa) e 2,40 dS m⁻¹ (fase produtiva).

A solução nutritiva aplicada foi dividida em fase vegetativa, que correspondeu do transplante até o enchimento dos frutos do primeiro cacho (48 DAT), e fase produtiva iniciada no enchimento dos frutos do primeiro cacho até o final do ciclo (122 DAT) (Tabela 2).

Tabela 2. Solução nutritiva utilizada para o cultivo de tomate cultivar Pizzadoro. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

NUTRIENTE	Fase	
	Vegetativa	Produtiva
	mg L ⁻¹	
N	137,00	157,20
P	47,74	53,50
K	229,00	296,00
Ca	104,50	142,50
Mg	37,00	50,00
S	66,00	122,50
B	1,99	1,99
Fe	3,77	3,77
Cu	0,46	0,46
Mn	0,46	0,46
Mo	0,09	0,09
Zn	0,18	0,18
Ni	0,09	0,09
EC (dS m ⁻¹)	1,76	2,40
pH	6,10	6,20

* Conmicros (2,0 % B; 2,0% Cu; 7,9 % Fe; 2,0% Mn; 0,4% Mo; 0,8% Zn)

2.6. Aplicação foliar de L-arginina

Cinco aplicações de L-arginina foram feitas durante o ciclo, aos 21; 39; 59; 79; 99 DAT com a utilização de pulverizador costal pressurizado por CO₂ acoplado a um bico tipo leque cerâmico AD 11004. Para melhor absorção foliar da L-arginina pelas folhas as pulverizações foram realizadas no período com temperaturas mais amenas, entre 17 e 19 horas. O volume aplicado variou conforme o desenvolvimento das plantas, entre 500 e 1200 L ha⁻¹.

2.7. Características avaliadas

2.7.1. Caracterização do ambiente de cultivo

Foram registrados os valores de temperatura, radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e umidade relativa do ar a cada 30 minutos no interior da casa-de-vegetação para caracterização do ambiente de produção. Para isso, utilizou-se uma miniestação meteorológica (Spectrum, Watchdog 2475 Plant Growth Station) localizada no centro da casa-de-vegetação, com os sensores posicionados a 1,5 m de altura.

2.7.2. Coleta de amostras para análises enzimáticas e quantificação de aminoácidos livres

As amostras de folha para a quantificação de aminoácidos e análises enzimáticas foram coletadas aos 64 DAT, quando as plantas possuíam pleno desenvolvimento, com a presença de flores e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Foram coletadas três folhas por parcela, sendo amostrada a quarta folha a partir do meristema apical. Logo após a retirada da folha, as mesmas foram identificadas e acondicionadas em papel alumínio e imediatamente congeladas em recipiente térmico contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram levadas ao laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP, onde foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha homogênea e acondicionadas em tubos Falcon de 15 mL para armazenamento em freezer a -80 °C.

2.7.2.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da produção de malonaldeído (MDA), que é um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), utilizando a metodologia proposta por Heath & Packer (1968). Para isso, as amostras foram maceradas com TCA (0,1%) em almofariz na proporção 1:100 (p/v) em conjunto com aproximadamente 20 % (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após a completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 250 µL e transferida para tubos tipo eppendorf juntamente com 1 mL da solução contendo TCA (20%) e TBA (0,5%). A

mistura foi colocada em banho-maria por 30 min a 95 °C. Logo em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas novamente por 10 minutos a 10.000 rpm.

A leitura das amostras foi realizada a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em mmol/g de matéria fresco.

2.7.2.2. Peróxido de hidrogênio

A quantificação de H₂O₂ foi determinada a partir da metodologia proposta por Alexieva et al., (2001). Para isso, as amostras foram maceradas com TCA (0,1%) em almofariz na proporção 1:100 (p/v). Após a homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 200 µL ao qual foi adicionado 800 µL de iodeto de potássio (1M) e 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). Após este procedimento, os tubos foram colocados em gelo protegidos da luz por uma hora. Após este período, as amostras foram mantidas por mais 15 minutos protegidas da luz, entretanto, em temperatura ambiente para estabilização da reação.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm, sendo que os resultados obtidos de H₂O₂ foram expressos em µmol/g de matéria fresca.

2.7.2.3. Extração e quantificação de proteínas solúveis

Para determinação das enzimas antioxidantes foi necessário fazer a extração e quantificação de proteínas, uma vez que a atividade enzimática é baseada na quantidade de proteína presente na amostra.

A extração de proteínas foi feita homogeneizando 1 g de material vegetal em almofariz, com 3 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM EDTA, 3 mM de DTT e 4% de PVPP (p/v) (Azevedo et al., 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante (extrato) foi dividido em alíquotas de 350 µL e armazenado em freezer a -80 °C para posterior determinação de SOD, CAT e APX.

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976), utilizando o BSA ("bovin serum albumina") como padrão, sendo que as leituras foram realizadas a 595 nm, e os resultados foram expressos em mg/mL.

2.7.2.3.1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada através de espectrofotometria, utilizando a metodologia proposta de Giannopolitis & Ries (1977) com modificações propostas por Cembrowska-Lech et al. (2015).

A determinação da SOD foi feita pela adição de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), 1,3 µM de riboflavina, 13 µM de metionina, 63 µM de NBT, 0,1 mM de EDTA e 100 µL do extrato proteico. A reação foi conduzida sob iluminação por 5 minutos e a leitura foi realizada na absorbância de 560 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

2.7.2.3.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada através da metodologia proposta por Kraus et al. (1995) com modificações propostas por Azevedo et al. (1998).

A solução de reação foi composta por 1 mL de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2,5 µL de H₂O₂ (30%). A reação foi iniciada com a adição de 15 µL do extrato proteico e a atividade foi determinada a 25 °C, a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio na absorbância de 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

2.7.2.3.3. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada através da metodologia proposta por Nakano & Asada (1981).

A solução de reação foi composta por 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM peróxido de hidrogênio e 0,1 mM EDTA e 50 mL do extrato proteico, em um volume total de 1 mL. A leitura foi realizada a 290 nm, observando-se a decomposição do peróxido de hidrogênio, com leituras a cada 10 segundos, por um período de um minuto. As soluções estoques de tampão fosfato de potássio, EDTA e ascorbato foram mantidas em banho-maria a 30 °C, e somente no momento da leitura a amostra e o peróxido de hidrogênio foram adicionados aos demais reagentes. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

2.7.2.4. Teor de aminoácidos livres nas folhas

Amostras de folha de tomateiro foram enviadas à empresa Ajinomoto para separação e análise de aminoácidos livres através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.7.3. Teor de nutrientes nas folhas

Aos 61 DAT foi realizada a coleta de folhas para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn, segundo metodologia descrita por Malavolta et al., (1997).

Para isso, foi coletada a quarta folha completamente expandida a partir do meristema apical de três plantas por parcela. Posteriormente, as folhas foram lavadas e secadas em estufa a 65°C, com circulação forçada de ar.

2.7.4. Produção

Dez colheitas foram realizadas ao longo do ciclo de cultivo com início aos 61 DAT até 122 DAT. Cujos frutos foram colhidos no estágio de amadurecimento pintando à maduro.

Em cada parcela, os frutos foram colhidos e separados em cinco diferentes classes em relação ao comprimento longitudinal dos frutos em pequenos (50-65 mm), médios (66-80 mm), grandes (81-100 mm), não

comerciais (>50 mm) e defeituosos (presença de doenças fisiológicas, e danos físicos), contabilizando o número e o peso dos frutos por classe.

A produção comercial foi composta pela somatória dos frutos das classes pequeno, médio e grande, e a produção total pela somatória da produção comercial, não comercial e defeituosos.

2.7.5. Qualidade

Para a determinação de sólidos solúveis, pH da polpa, acidez total titulável (ATT), e teor de ácido ascórbico, foram selecionados 6 frutos maduros por parcela aos 81 DAT. Os frutos foram triturados e homogeneizados com processador de alimentos e a polpa foi utilizada para as determinações das análises qualitativas.

O teor de sólidos solúveis foi determinado com a leitura direta da polpa através de um refratômetro digital, sendo o valor expresso em graus Brix (°Brix). A determinação do pH da polpa foi realizada com a leitura direta da polpa, através de um medidor de pH.

A acidez titulável foi determinada através da colocação de uma alíquota de 10 g de polpa diluída em 100 mL de água destilada com a titulação de NaOH 0,1N, até que a solução atingisse pH 8,1, segundo a metodologia recomendada pela AOAC (2016) cujos resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

Para a determinação do teor de ácido ascórbico utilizou-se 10 g da polpa diluídas em 50 mL de ácido oxálico (1%), e titulação com 2,6 diclorofenol- indofenol (DCFI) até o ponto de viragem, sendo que os resultados obtidos foram expressos em mg/100 g de polpa (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

2.8. Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Levene para homogeneidade de variância e de Shapiro-wilk para a normalidade dos resíduos, atendidas as pressuposições, realizou-se a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o software R versão 3.2.5.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização do microclima da casa-de-vegetação.

A temperatura média durante a condução do experimento foi de 25,1 °C, sendo que a temperatura mínima absoluta foi de 14,8 °C (67 DAT) e a temperatura máxima absoluta foi de 40,0 °C (86 DAT) (Figura 1). Durante o ciclo, da cultura 25% dos dias apresentaram temperaturas máximas superiores a 35 °C, sendo que o mês de dezembro (14-44 DAT) foi o mais quente, com temperatura média de 25,6° C e temperatura máxima média de 33,6 °C (Figura 1). Nesse mês houve a emissão dos primeiros botões florais das plantas de tomateiro.

Em relação à radiação fotossinteticamente ativa, houve um valor médio de 18,8 mol m⁻² dia⁻¹ durante a condução do experimento, com um valor mínimo de 4,6 aos 57 DAT e máximo de 34,2 mol m⁻² dia⁻¹ aos 32 DAT.

Figura 1. Radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura média (T Méd), temperatura máxima (T Máx) e temperatura mínima (T Mín) registradas durante a condução do experimento. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

Com relação à umidade relativa do ar, o valor médio durante a condução do experimento foi de 80%, com a UR mínima de 29,5% (32 DAT) e máxima de 100% (Figura 2). A alta umidade relativa ocorreu porque a condução do experimento foi realizada no período de maior precipitação na região de Piracicaba-SP o que interferiu no microclima na casa-de-vegetação. Além disso, a amplitude térmica entre dia e noite na casa-de-vegetação, foi responsável pela ocorrência de umidade relativa de 100% entre o final da noite e início da manhã, e consequentemente houve formação de orvalho.

Figura 2. Umidade relativa média (UR Méd), máxima (UR Máx) e mínima (UR Mín) registradas durante a condução do experimento. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

3.2. Indicadoras de estresse e enzimas antioxidantes

A aplicação foliar de L-arginina influenciou significativamente a produção de malonaldeído (MDA), assim como a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Entretanto, esse aminoácido não afetou a produção de peróxido de hidrogênio e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Tabela 3).

A aplicação foliar de 0,5 e 2,0 g L⁻¹ de L-arginina resultou em produção de MDA 49,4% e 47,2 % superior em relação à aplicação de 1,0 g L⁻¹ de L-arginina. Plantas não tratadas com L-arginina (controle) apresentaram produção de 55,9% superior de MDA em relação à dose 1,0 g L⁻¹. Para a maior dose de L-arginina (2,0 g L⁻¹) a ocorrência de fitotoxicidade provocada pela concentração elevada deste aminoácido aplicado na folha pode ter contribuído para o aumento da quantidade deste composto (MDA) que é oriundo da peroxidação lipídica, sendo um indicador de dano oxidativo às membranas. Porém não há explicação para o aumento da concentração deste composto com o uso da dose 0,5 g L⁻¹.

Já em relação à atividade das enzimas antioxidantes, a dose de 1,0 g L⁻¹ de L-arginina proporcionou maior produção de CAT e APX em relação ao controle, com aumento de 34,1% e 33,2 %, respectivamente (Tabela 3). Ambas as enzimas são importantes no processo de metabolização do peróxido de hidrogênio em água, sendo que para as células vegetais o APX é o considerado o substrato mais importante na detoxificação do H₂O₂. Apesar do aumento de ambas as enzimas antioxidantes, a análise dos teores de peróxido de hidrogênio nas folhas de tomateiro não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos.

O mesmo ocorreu com a SOD, que é considerada a primeira barreira de proteção contra as espécies reativas ao oxigênio, convertendo o O₂^{•-} em H₂O₂, ou seja, a L-arginina não afetou a produção desta enzima.

Tabela 3. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (Superóxido dismutase), CAT (Catalase), APX (Ascorbato peroxidase) e quantidade de indicadores de estresse, MDA (malonaldeído) e PER (peróxido de hidrogênio) em folhas de tomateiro cultivar Pizzadoro em função da aplicação de L-arginina realizada aos 64 DAT. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

L-arginina	SOD	CAT	APX	MDA	PER
g L ⁻¹	(U SOD mg prot ⁻¹)	(μ mol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)		(mmol g MF ⁻¹)	(μ mol g MF ⁻¹)
Controle	20,22	54,79 b	131,83 b	5,05 a	3,46
0,15	15,46	61,28 ab	155,42 ab	3,98 ab	3,23
0,25	16,64	58,99 ab	169,97 ab	4,49 ab	3,72
0,50	19,47	63,06 ab	159,90 ab	4,84 a	3,69
1,0	19,21	73,46 a	175,57 a	3,24 b	2,86
2,0	17,80	68,83 ab	153,62 ab	4,77 a	2,70
p $\leq$ 0,05	ns	*	*	*	ns
C.V.	10,92	8,36	9,23	11,82	21,36

ns, *, ** Não significativo ou significativo a $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$, respectivamente.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$

3.3. Teor de aminoácidos livres nas folhas

Os teores de aminoácidos livres nas folhas do tomateiro não foram afetados de modo significativo pelas doses de L-arginina aplicadas por pulverizações nas folhas tomateiros (Tabela 4).

Tabela 4. Teores dos aminoácidos Cis (Cisteína), Met (Metionina), Asp (Aspartato), Thr (treonina), Ser (Serina), Glu (Glutamato), Gly (Glicina), Ala (Alanina), Val (Valina), Ile (Isoleucina), Leu (Leucina) Tyr (Tirocina) Phen (Fenilalanina), Lys (Lisina), His (Histidina), Arg (Arginina) Prol (prolina) e AA (aminoácidos livres totais) em folhas de tomateiro cultivar Pizzadoro em função da aplicação de L-arginina aos 64 DAT. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

L-arginina	Cis	Met	Asp	Thr	Ser	Glu
g L ⁻¹	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle	0,030	0,066	0,333	0,144	0,150	0,398
0,15	0,027	0,066	0,325	0,142	0,137	0,363
0,25	0,027	0,070	0,352	0,154	0,154	0,398
0,50	0,028	0,070	0,351	0,152	0,152	0,383
1,0	0,030	0,069	0,346	0,154	0,152	0,378
2,0	0,027	0,062	0,329	0,146	0,148	0,369
p ≤ 0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.	7,35	10,07	8,56	8,77	7,06	6,83
L-arginina	Gly	Ala	Val	Isol	Leu	Tyr
g L ⁻¹	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle	0,187	0,198	0,199	0,167	0,303	0,120
0,15	0,180	0,188	0,191	0,173	0,286	0,111
0,25	0,195	0,204	0,208	0,165	0,313	0,130
0,50	0,193	0,201	0,203	0,170	0,309	0,118
1,0	0,189	0,201	0,199	0,241	0,309	0,119
2,0	0,180	0,192	0,193	0,178	0,294	0,113
p ≤ 0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.	6,77	6,89	6,99	29,91	6,71	6,79
L-arginina	Phen	Lis	His	Arg	Prol	AA
g L ⁻¹	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle	0,201	0,223	0,076	0,207	0,112	3,114
0,15	0,186	0,214	0,069	0,190	0,097	2,944
0,25	0,219	0,233	0,070	0,202	0,108	3,202
0,50	0,206	0,230	0,075	0,210	0,130	3,181
1,0	0,203	0,227	0,076	0,203	0,103	3,197
2,0	0,190	0,218	0,071	0,200	0,099	3,008
p ≤ 0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.	5,90	6,38	7,95	8,96	14,39	5,76

ns, *, ** Não significativo ou significativo a $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$, respectivamente.

3.4. Teor de nutrientes nas folhas

Os teores de nutrientes determinados nas folhas do tomateiro não foram afetados pela aplicação de L-arginina (Tabela 5).

As médias dos valores encontrados para P, Mg e S foram de 6,1; 4,3 e 4,8 g kg⁻¹, respectivamente, estando dentro das faixas adequadas para estes nutrientes (4 a 8 g kg⁻¹ para P; 4 a 8 g kg⁻¹ para Mg e 3 a 10 g kg⁻¹ para S) de acordo com Silva (2009).

Da mesma forma, os teores médios de Fe, Zn, Mn e B, que foram de 106,4; 103,4; 271,2 e 38,7 mg kg⁻¹, respectivamente, estavam dentro das faixas consideradas adequadas (100 a 300 mg kg⁻¹ para o Fe; 30 a 100 mg kg⁻¹ para o zinco; 50 a 250 mg kg⁻¹ para o Mn; e 30 a 100 mg kg⁻¹ para o B) por Silva (2009).

Os teores médios de N, K e Ca de 34,5 g kg⁻¹, 27,61 g kg⁻¹ e 9,8 g kg⁻¹, estavam levemente abaixo das faixas ideais, que foram de 40-60 g kg⁻¹; 30-50 g kg⁻¹ e 14-40 g kg⁻¹, respectivamente estabelecidas por Silva (2009) para K, e Silva & Giordano (2000) para N e Ca.

Somente o Cu, com teor médio 243,9 mg kg⁻¹, ficou acima da faixa considerada adequada por Silva & Giordano (2000), que foi de 10 a 20 mg kg⁻¹, muito provavelmente devido às aplicações de produtos cúpricos.

Tabela 5. Teor de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (Cu, Fe, Zn, Mn, B), em folhas de tomateiro cultivar Pizzadoro em função da aplicação de L-arginina realizada aos 61 DAT. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

L-arginina	N	P	K	Ca	Mg	S
g L ⁻¹	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)
Controle	35,00	6,10	24,73	9,30	4,66	4,30
0,15	31,73	6,10	30,10	10,27	4,33	5,67
0,25	32,90	5,77	27,00	8,90	4,17	4,90
0,50	35,93	6,13	30,30	11,07	4,27	5,10
1,0	35,00	6,17	28,67	10,43	4,50	4,77
2,0	36,40	6,13	24,83	9,03	4,12	4,27
p ≤ 0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.	10,77	4,43	14,31	11,97	10,07	12,34

L-arginina	Cu	Fe	Zn	Mn	B
g L ⁻¹	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
Controle	263,33	116,00	124,33	284,66	37,00
0,15	260,67	116,00	102,00	266,66	40,66
0,25	227,33	94,67	93,33	240,00	40,66
0,50	245,33	106,67	107,33	290,00	39,00
1,0	246,00	104,00	100,33	284,66	39,66
2,0	220,67	101,33	93,00	261,33	35,00
p ≤ 0,05	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.	8,49	12,42	26,46	14,67	20,28

ns, *, ** Não significativo ou significativo a p ≤ 0,05 ou p ≤ 0,01, respectivamente.

3.5. Produção e qualidade

A aplicação foliar de L-arginina influenciou de modo significativo o número de frutos grandes (NFG), o número de frutos não comerciais (NFNC), o número de frutos comerciais (NFC) e o número de frutos totais (NFT) (Tabela 6). Esse aminoácido também influenciou a produção de frutos grandes (PROG), a produção comercial (PC) e total (PT) (Tabela 7).

A aplicação de L-arginina na dose 0,25 g L⁻¹ proporcionou um aumento significativo no número e na produção de frutos grandes (g planta⁻¹) em relação ao controle e as doses 0,15 e 0,5 g L⁻¹. Entretanto, cabe ressaltar

que o número e a produção de frutos dentro desta classe (grande), representaram somente 3,3 % e 4,8%, do número de frutos comerciais e produção comercial, respectivamente. (Tabela 6 e 7).

Com relação ao número e a produção de frutos comerciais, que compreende a somatória do número de frutos de calibre pequeno, médio e grande, a aplicação de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de L-arginina proporcionou um aumento de 33,0% e 38,5%, respectivamente, em relação ao controle, sendo que o aumento da produção ocorreu devido ao maior número de frutos e não ao aumento da massa média dos frutos. Além disso, esta dose diminuiu 43,6% o número de frutos de calibre não comercial em relação ao controle (Tabelas 6 e 7). A maior parte dos frutos classificados como não comerciais foram originados por polinização deficiente (Figura 3).

Figura 3. Frutos da classe não comercial com polinização deficiente (A), e não polinizados (B). Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

Na produção total, que compreende a somatória de frutos comerciais, não comerciais e com presença de defeitos, o controle apresentou redução 11,5% no número de frutos em relação ao tratamento $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de L-arginina, e uma produção (g/planta) de 19,3%; 20,5% e 22,3 % inferior em relação aos tratamentos 0,25; 0,5 e $1,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tabelas 6 e 7). O controle, porém, não diferiu estatisticamente da aplicação de 0,15 e $2,0 \text{ g L}^{-1}$. A maior dose de L-arginina provocou sintoma de toxidez nas folhas, caracterizada pela necrose no limbo foliar, o que pode ter contribuído para redução na produção.

Tabela 6. NFP (número de frutos pequenos), NFM (número de frutos médios), NFG (número de frutos grandes), NFNC (número de frutos não comerciais), NFD (número de frutos com defeitos), NFC (número de frutos comerciais) e NTF (número de frutos totais) por planta, em função da aplicação L-arginina em tomateiro cultivar Pizzadoro. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016).

L-arginina (g L ⁻¹)	NFP	NFM	NFG	NFNC	NFD	NFC	NTF
Controle	14,66	18,72	0,17 c	11,33 a	0,55	33,55 b	45,43 b
0,15	14,33	23,28	1,11 bc	7,56 ab	0,45	38,72 ab	46,73 ab
0,25	15,33	24,28	2,50 a	7,28 ab	0,83	42,11 ab	50,22 ab
0,50	15,06	24,21	1,06 bc	9,50 ab	0,72	40,33 ab	50,55 ab
1,0	14,56	28,56	1,50 ab	6,39 b	0,33	44,61 a	51,33 a
2,0	12,18	25,55	1,49 ab	8,33 ab	0,22	39,22 ab	47,77 ab
p ≤ 0,05	ns	ns	**	*	ns	*	*
C.V.	16,74	15,28	33,67	16,70	60,21	9,57	4,10

ns, *, ** Não significativo ou significativo a p ≤ 0,05 ou p ≤ 0,01, respectivamente.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a p ≤ 0,05

Tabela 7. PROP (produção de frutos pequenos), PROM (produção de frutos médios), PROG (produção de frutos grandes), PRNC (produção de frutos não comerciais), PRDEF (produção de frutos com defeitos), PC (produção comercial), PT (produção total) por planta, em função da aplicação L-arginina em tomateiro cultivar Pizzadoro. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016).

L-arginina (g L ⁻¹)	PROP (g)	PROM (g)	PROG (g)	PRNC (g)	PRDEF (g)	PC (g)	PT (g)
Controle	1035,81	2007,08	20,67 c	359,11	48,66	3063,56 b	3471,33 b
0,15	1070,97	2442,68	157,76 bc	275,37	53,09	3671,41 ab	3999,87 ab
0,25	1082,20	2558,80	350,74 a	240,61	70,61	3991,74 ab	4302,95 a
0,50	1123,52	2661,22	151,33 bc	321,46	107,27	3936,07 ab	4364,80 a
1,0	1044,25	2998,32	201,69 ab	203,41	18,24	4244,26 a	4465,91 a
2,0	862,57	2670,79	198,19 ab	292,35	21,38	3731,55 ab	4045,28 ab
p ≤ 0,05	ns	ns	**	ns	ns	*	*
C.V.	16,11	14,91	34,17	20,41	89,64	9,83	7,01

ns, *, ** Não significativo ou significativo a p ≤ 0,05 ou p ≤ 0,01, respectivamente.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a p ≤ 0,05

Em relação às características qualitativas, somente o pH da polpa foi influenciado pela aplicação de L-arginina, sendo que a dose de 2,0 g L⁻¹ proporcionou aumento de 1,38%; 1,61% e 1,38 % em relação ao controle e às doses 0,15 e 0,5 g L⁻¹, respectivamente. As demais características analisadas (sólidos solúveis, ácido ascórbico, acidez titulável e relação AT/SST) não demonstram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8. SST (sólidos solúveis), pH (pH da polpa), AA (concentração de ácido ascórbico), ATT (acidez total titulável), e relação ATT/SST dos frutos de tomate cultivar Pizzadoro em função da aplicação de L-arginina. Piracicaba, ESALQ/USP, 2015/2016.

L-arginina	SST	pH	AA	ATT	ATT/SST
(g L ⁻¹)	(° Brix)		(mg 100 g ⁻¹)	(% de ácido cítrico)	
Controle	5,20	4,35 b	15,29	0,540	9,67
0,15	5,30	4,34 b	14,92	0,537	9,90
0,25	5,20	4,37 ab	15,01	0,530	9,90
0,5	5,17	4,35 b	15,28	0,533	9,73
1,0	5,20	4,36 ab	14,98	0,550	9,43
2,0	5,07	4,41 a	14,81	0,500	10,13
p ≤ 0,05	ns	**	ns	ns	ns
C.V.	1,91	0,47	4,84	5,92	5,76

ns, *, ** Não significativo ou significativo a $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$, respectivamente.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$

4. DISCUSSÃO

A L-arginina é um dos aminoácidos mais funcionais nas células vivas, sendo importante no armazenamento e transporte de nitrogênio orgânico nas plantas, síntese proteica e precursora da biossíntese de poliaminas, agmatina e prolina, assim como de moléculas sinalizadoras, como a glutamina e o óxido nítrico (Chen et al., 2004; Liu et al., 2006; Winter et al., 2015). Todas essas moléculas desempenham papel importante no processo de crescimento, desenvolvimento e proteção das plantas. Todavia as que mais se destacam são as poliaminas, o óxido nítrico e a prolina. As poliaminas são aminas alifáticas presentes em todas as células das plantas que interagem com o DNA, RNA, proteínas e fosfolípidios, fazendo com que esta molécula esteja envolvida nas regulações físicas e químicas da membrana celular; na estrutura do ácido nucleico; na modulação de enzima; no estímulo à divisão celular; na regulação da organogênese; na embriogênese; na iniciação e desenvolvimento floral; no crescimento do tubo polínico; no desenvolvimento e amadurecimento de frutos e nas respostas ao estresse biótico e abiótico (Bouchereau et al., 1999; Galston et al., 1997; Tiburcio et al., 2014; Zhao e Yang, 2008). O óxido nítrico é uma molécula gasosa altamente difusível que atua na sinalização de diversos processos fisiológicos como germinação, crescimento das raízes, fechamento de estômatos, florescimento e respostas aos estresses bióticos e abióticos, entre outros (Desikan et al., 2004; Lamattina et al., 2003). A prolina é um aminoácido que além de sua função no metabolismo primário das plantas, é constantemente citado como uma molécula sinalizadora em situações de estresse da planta e que atua também como osmoprotetor e na homeostase da célula (Hayat et al., 2012; Szabados & Savouré, 2010).

Durante o ciclo do tomateiro, a temperatura foi o fator ambiental que mais influenciou a fisiologia e a produtividade do tomate cultivar Pizzadoro, uma vez que 25% do período de cultivo apresentou temperaturas superiores a 35°C, consideradas inadequadas para o crescimento e desenvolvimento das plantas, principalmente durante o período reprodutivo.

Estudos indicam que a temperatura ideal para crescimento e reprodução do tomateiro é de 21 a 24 °C durante o dia, e 14 a 17 °C durante a noite (Geisemburg & Steward 1986). Nessas condições, processos metabólicos que ocorrem em organelas como cloroplasto, mitocôndria e peroxissomos produzem continuamente espécies reativas ao oxigênio (ERO's) que são oriundos da transferência de elétrons desemparelhados para o oxigênio molecular (O₂), gerando superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH^{*}), ao mesmo tempo em que estas moléculas são eliminadas pelo sistema antioxidante das plantas (Foyer e Noctor, 2005).

Entretanto, em elevadas temperaturas há alterações de ordem fisiológica e metabólicas nas plantas, modificando as estruturas de complexos de proteínas do cloroplasto (Ahmad et al., 2009). Com isso, as reações fotoquímicas e bioquímicas na membrana do tilacóide e no metabolismo do carbono no estroma do cloroplasto são afetados (Wise et al., 2004). Notadamente, a mitocôndria e, principalmente, o cloroplasto são os locais onde ocorrem os principais processos energéticos das plantas como a respiração e a fotossíntese. Quando há quebra deste equilíbrio entre a produção e eliminação ocorre um aumento nos níveis intracelulares de ERO's, que podem causar danos às estruturas das células com o comprometimento da membrana lipídica e consequentemente da sua permeabilidade e funções. Isso dificulta as atividades metabólicas e afeta o crescimento e o rendimento das plantas através da limitação das atividades do fluxo metabólico (Bita & Gerats, 2013; Gill & Tuteja, 2010; Sairam et al., 2002; Xu et al., 2006). Para contrapor a produção excessiva de ERO'S as plantas possuem um sistema antioxidante enzimático composto por catalase, superóxido dismutase, peroxidase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, e também

antioxidantes não enzimáticos tais como ácido ascórbico, glutatona, carotenóides, α -tocoferol e compostos fenólicos (Garbero et al., 2011).

Nesse estudo foi possível constatar que a aplicação de 1 g L^{-1} de L-arginina proporcionou menor produção de MDA, que é um dos produtos oriundo do processo de dano oxidativo à membrana da célula e é utilizado para quantificar o processo de peroxidação lipídica (Dewir et al., 2006). Além disso, proporcionou maior atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX em relação ao controle. Ambas enzimas desempenham importante papel na detoxificação do excesso de H_2O_2 , apresentando um efeito na proteção das células e seus componentes. Estes resultados indicam que a L-arginina e os produtos oriundos do seu metabolismo tem efeito sobre o estresse oxidativo, auxiliando na estabilização e permeabilidade da membrana celular, e evitando que ocorra a reação em cadeia da peroxidação lipídica (Beligni & Lamattina, 2002; Groppa et al., 2001; Zhao & Yang, 2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Khalil et al. (2009), que relataram o efeito da aplicação de 2,5 mM de L-arginina na diminuição do conteúdo de MDA, assim como do aumento da atividade da CAT em plantas de trigo submetidos a estresse térmico (35°C). Zhang et al., (2010) também constataram a diminuição do conteúdo de MDA e aumento da atividade da CAT e APX mediante a aplicação 0,2 mM de L-arginina diretamente sobre frutos de tomate submetidos ao estresse térmico por baixa temperatura (2°C). Ambos os estudos também apresentaram aumento da atividade da enzima SOD, porém nesse estudo a atividade dessa enzima não foi alterada.

A produtividade também expressou positivamente o efeito da aplicação da L-arginina no tomateiro, pois esse aminoácido aliviou o estresse provocado pelas elevadas temperaturas.

Os efeitos negativos das elevadas temperaturas na produtividade do tomateiro depende do estágio de desenvolvimento do vegetal. No período reprodutivo, a microsporogênese é afetada em temperaturas ligeiramente acima do ideal (Peet et al., 1998), tanto na produção de pólen como na viabilidade dos mesmos (Pressman et al., 2002; Sato et al., 2000), afetando o florescimento e consequentemente a produção de frutos.

Nesse estudo, na fase do florescimento ocorreu alteração na fertilização resultando em maior número de frutos não comerciais em plantas não tratadas com L-arginina, resultantes da polinização deficiente. Esse fato pode ser atribuído à falha na fertilização devido à diminuição na germinação do pólen e alongação do tubo polínico (Abdul-Baki & Stommel, 1995; Sato et al., 2000). É provável que a atenuação do estresse observado nas análises enzimáticas, assim como compostos oriundos do metabolismo da L-arginina tiveram efeito na proteção e promoção do florescimento em situação de estresse térmico, uma vez que na literatura compostos como as poliaminas estão relacionados ao processo de germinação e maturação de pólenes, como na modulação de resposta a uma diversidade de estresses ambientais (Bagni et al., 1981; Bouchereau et al., 1999; Chibi et al., 1994; Galston et al., 1997; Tiburcio et al., 2014). Além disso, os efeitos protetores das enzimas antioxidantes aos principais processos energéticos das plantas podem ter auxiliado na manutenção da atividade metabólica da planta diante de uma situação de estresse térmico, auxiliando na manutenção da produtividade. Resultados semelhantes foram obtidos por Ahmad et al., (2010) com aplicação de 200 ppm de arginina em duas cultivares de sorgo submetidos ao estresse hídrico, onde houve aumento significativo dos componentes de crescimento (matéria seca, altura da planta, área foliar) e de produção (peso de panícula, massa de mil sementes, produtividade), assim como aumento da SOD e CAT, e diminuição da quantidade de MDA, em comparação às plantas não tratadas.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível constatar o efeito do aminoácido L-arginina no aumento da produtividade de tomate cultivar Pizzadoro, assim como os indícios dos benefícios das moléculas oriundas do metabolismo da L-arginina em condições de cultivo com temperatura elevada, através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX, e menor produção de MDA. Entretanto, estudos moleculares futuros devem ser realizados para elucidar quais as moléculas oriundas do metabolismo da L-arginina tiveram maior impacto sobre a diminuição do estresse, e aumento na produtividade.

REFERÊNCIAS

- Abdul-Baki, A.A., Stommel, J.R., 1995. Pollen Viability and Fruit Set of Tomato Genotypes under Optimum- and High-temperature Regimes. *Hortscience* 30, 115–117.
- Ahmad, A., Diwan, H., Abrol, Y.P., 2009. Global Climate Change, Stress and Plant Productivity, in: *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 503–521.
- Ahmad, A.G., Bekheta, M.A., Orabi, S.A., 2010. *International Journal of Academic Research*. Azerbaijão.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344.
- AOAC, 2016. *AOAC Official Methods of Analysis*, 20th ed. Washington.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Bagni, N., Adamo, P., Serafini-Fracassini, D., Villanueva, V.R., 1981. RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* 68, 727–30.
- Beligni, M. V., Lamattina, L., 2002. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell Environ.* 25, 737–748.
- Bita, C.E., Gerats, T., 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.* 4, 273.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140, 103–125.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Costa, J.O., Almeida, A.N., Coelho, R.D., Folegatti, M.V., José, J.V., 2015. Modelos de estimativa de elementos micrometeorológicos em ambiente protegido. *Water Resources and Irrigation Management* 4, 25–31.
- Cembrowska-Lech, D., Koprowski, M., Kepczyński, J., 2015. Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H_2O_2 and O_2^-) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. *J. Plant Physiol.* 176, 169–179.
- Chen, H., McCaig, B.C., Melotto, M., He, S.Y., Howe, G.A., 2004. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *J. Biol. Chem.* 279, 45998–46007.
- Chibi, F., Matilla, A.J., Angosto, T., Garrido, D., 1994. Changes in polyamine synthesis during anther development and pollen germination in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol. Plant.* 92, 61–68.
- Desikan, R., Cheung, M.-K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55, 205–12.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environ. Exp. Bot.* 58, 93–99.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Current perspective essay Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875.

- Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E., Scharf, K.-D., 2015. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant. Cell Environ.* 38, 1881–1895.
- Furlan, R. A.; Folegatti, M. V., 2002. Distribuição vertical e horizontal de temperaturas do ar em ambientes protegidos. *Rev. Bras. de Eng. Agríc. e Amb.*, v.6, p.93-100.
- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A.F., 1997. Plant Polyamines in Reproductive Activity and Response to Abiotic Stress*. *Bot. Acta* 110, 197–207.
- Garbero, M., Pedranzani, H., Zirulnik, F., Molina, A., Pérez-Chaca, M.V., Vigliocco, A., Abdala, G., 2011. Short term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta Physiol Plant* 33: 497–507
- Geisenberg C, Stewart K., 1986. Field crop management. In: Atherton J, Rudich J (eds) *The tomato crop*. Springer, Amsterdam, pp 511–557
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases 59, 309–314.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*
- Groppa, M.D., Benavides, M., 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P., 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161, 481–488.
- Guy, C., 1999. The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. In *Plant Responses to Environmental Stresses* (ed. H.R. Lerner), pp. 497–548. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environmental. *Plant Signal. Behav.* 1456–1466.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., and Herrero, M., 2009. Global warming and sexual plant reproduction. *Trends Plant Sci.* 14, 30–36.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Howarth, C.J., 2005. Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: Ashraf, M., Harris, P.J.C. (Eds.), *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. Howarth Press Inc., New York.
- Instituto Adolfo Lutz., 2008. Métodos físicos e químicos para análises de alimentos. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p.
- Khalil, S. I., El – Bassiouny, H. M. S., Hassanein, R. A., Mostafa, H. A. M., El – Khawas, S. A., Abdel – Monem, A. A., 2009. Antioxidant defense system in heat shocked wheat plants previously treated with arginine or putrescine. *Austr. J. of Basic and Applied Sci.*, 1517-1526.
- Kraus, T.E., McKersie, B.D., Austin Fletcher, R., 1995. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. *J. Plant Physiol.*
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G., 2003. Nitric oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 109–136.

- Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M., Moriguchi, T., 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: Importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* 57, 2589–2599.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A., 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Potafós, Piracicaba.
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P., 2012. How do plants feel the heat? *Trends Biochem. Sci.* 37, 118–125.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Nunhems., 2016 Pizzadoro tomate híbrido tipo saladete (italiano) indeterminado. Disponível em: <<http://nunhems.com.br>> Acesso em: 18 Set. 2016.
- Peet, M.M., Sato, S., Gardner, R.G., 1998. Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant, Cell Environ.* 21, 225–231.
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Jansen, M.A.K., 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant. Cell Environ.* 32, 158–169.
- Pressman, E., Peet, M.M., Pharr, D.M., 2002. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann. Bot.* 90, 631–6.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163, 1037–1046.
- Sato, S., Peet, M.M., Thomas, J.F., 2000. Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant, Cell Environ.* 23, 719–726.
- Siddiqui, M.H., Al-Wahaibi, M.H., Basalah, M.O., 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248, 447–455.
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2a Edição. ed. Embrapa, Brasília.
- Silva, J.B., Giordano, L.B., 2000. Tomate para processamento industrial. Embrapa Hortaliças, Brasília.
- Szabados, L., Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., and Nayyar, H. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops, an overview. *Environ. Exp. Bot.* 67, 429–443.
- Teruel, B. J., 2010. Controle automatizado de casas de vegetação: variáveis climáticas e fertigação. *Ver. Bras. de Eng. Agríc. e Amb.*, v.14, p.237-245.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M., Alcázar, R., 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: From development to stress. *Planta* 240, 1–18.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199–223.
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., Funck, D., 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.*
- Wise, R.R., Olson, A.J., Schrader, S.M., Sharkey, T.D., 2004. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell Environ.* 27, 717–724.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L., 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exp. Bot.* 56, 274–285.

- Zhang, X.H., Shen, L., Li, F.J., Zhang, Y.X., Meng, D.M., Sheng, J.P., 2010 Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. *J Sci Food Agric* 90:2195–2202.
- Zhao, H., Yang, H., 2008. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 116, 442–447.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Instalação do experimento

(A) Vasos preenchidos com substrato de fibra de coco (B) Mudas de tomate produzidas em bandejas plásticas de 128 células (C) Mudas de tomate transplantadas no vaso (1 DAT) (D) Sensor Irrigação no momento da instalação.

APÊNDICE B. Desenvolvimento das plantas de tomateiro

Plantas de tomateiro aos (A) 20 DAT, (B) Formação de frutos aos 37 DAT, (C) 45 DAT, (D) 59 DAT, (E)74 DAT e (F) 100 DAT.

APÊNDICE C. Colheita e análise de qualidade dos frutos

(A) Colheita dos frutos (B) Separação das respectivas parcelas (C) Frutos utilizados na análise qualitativa (D) Medição do ° Brix com refratômetro digital (E) Titulação para análise de teor de ácido ascórbico (F) Titulação para análise de acidez total titulável.

APÊNDICE D. Procedimento para aplicação de L-arginina foliar

(A) Pesagem da L-arginina utilizada no experimento (B) Aplicação foliar de L-arginina com pulverizador pressurizado por CO₂, (C) e (D) Fitotoxidez nas folhas de tomateiro ocorridas com a aplicação da dose 2,0 g L⁻¹ de L-arginina.

APÊNDICE E. Classe de frutos do experimento

(A) Frutos de tomate com polinização deficiente (B) Frutos que não houve polinização (C) Comparação de frutos da classe comercial e não comercial (D) padrão de frutos com polinização adequada.

APÊNDICE F. Análises bioquímicas

(A) Coleta de folhas para análises bioquímicas, (B) Armazenamento em nitrogênio líquido logo após a coleta, (C) Maceração das folhas em nitrogênio para realização das análises, (D) Extração de proteínas das folhas