UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

GUSTAVO RIBEIRO BARZOTTO

APLICAÇÃO FOLIAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TOMATEIRO ESTIMULA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

Botucatu

2023

GUSTAVO RIBEIRO BARZOTTO

APLICAÇÃO FOLIAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TOMATEIRO ESTIMULA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura)

Orientador(a): Carmen Sílvia Fernandes Boaro

Botucatu

2023

B296a

Barzotto, Gustavo Ribeiro

Aplicação foliar de peróxido de hidrogênio em tomateiro estimula tolerância ao déficit hídrico / Gustavo Ribeiro Barzotto. -- Botucatu, 2023 89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu

Orientadora: Carmen Sílvia Fernandes Boaro

1. Fisiologia Vegetal. 2. Estresse abiótico. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Aclimatação sistêmica adquirida. 5. Solanum lycopersicum L.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: APLICAÇÃO FOLIAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TOMATEIRO ESTIMULA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

AUTOR: GUSTAVO RIBEIRO BARZOTTO
ORIENTADORA: CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Horticultura), pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO (Participaçao Presencial)
Biodiversidade e Bioestatistica / Instituto de Biociencias de Botucatu UNESP

Prof. Dr. IVÁN DE LA CRUZ CHACÓN (Participaçao Virtual)
Laboratório de Fisiologia e Química Vegetal / Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Prof.ª Dr.ª VILMA MARQUES FERREIRA (Participaçao Virtual)
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES (Participaçao Presencial)
Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. MILTON COSTA LIMA NETO (Participaçao Virtual)
Ciências Biológicas e Ambientais / Insituto de Biociências da UNESP - Campus do Litoral - São Vicente

Botucatu, 05 de abril de 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o apoio incondicional.

À minha orientadora professora doutora Carmen Sílvia Fernandes Boaro por todo o auxílio e ensinamentos prestados durante o doutorado, e pelo exemplo de profissional que desperta admiração e respeito e magnifica o sentido de ser professor.

Aos meus amigos, companheiros de laboratório que contribuíram de muitas formas para a realização desse trabalho, sem vocês não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

RESUMO

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie reativa de oxigênio, apesar de potencialmente danoso, atua na sinalização de diversos processos no metabolismo vegetal, como crescimento e respostas a estresses abióticos, como a seca. Objetivou-se neste trabalho verificar se a aplicação exógena de H_2O_2 interfere no desempenho fotossintético, produção de biomassa e no ajuste metabólico de tomateiro submetido ou não à período de seca. O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x3, sendo duas condições hídricas: plantas regadas e plantas submetidas à seca, e três aplicações foliares: zero, uma ou duas aplicações foliares de 1 mM de H_2O_2. As avaliações foram realizadas em dois momentos, primeiro, durante o período em que parte das plantas estavam submetidas a seca, e segundo, após essas plantas estarem recuperadas pelo retorno da rega. Foram realizadas avaliações de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, curva de carboxilação da RuBisCo, análise de crescimento, acúmulo de massa seca, conteúdo relativo de água, potencial água da folha, carboidratos, perfil químico de açúcares, pigmentos foliares, peroxidação lipídica, concentrações foliares de peróxido de hidrogênio, fenóis e prolina e atividade de enzimas antioxidantes. Concluiu-se que aplicação exógena de H_2O_2 incrementa o desempenho fotossintético de plantas cultivadas sob regime normal de rega e na seca e ajustes metabólicos dependem do número de aplicações de H_2O_2, assim como aplicação exógena de H_2O_2 incrementa a produção de biomassa de plantas cultivadas sob regime normal de rega, tendo atuado na sinalização de reações fotossintéticas e proteção ao déficit hídrico, com potencial uso para aclimatação sistêmica adquirida.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigênio; aclimatação sistêmica adquirida; metabolismo primário; promoção de crescimento, ajuste osmótico.

ABSTRACT

Hydrogen peroxide (H_2O_2), a reactive oxygen species, although potentially harmful, acts in the signaling of several processes in plant metabolism, such as growth and responses to abiotic stresses, such as drought. The aim of this work was to verify if the H_2O_2 exogenous application interferes in the photosynthetic performance, biomass production and in the metabolic adjustment of tomato plants submitted or not to a period of drought. The experiment was conducted in a randomized block design, in a 2x3 factorial scheme, with two water conditions: watered plants and plants subjected to drought, and three foliar applications: zero, one or two foliar applications of 1 mM H_2O_2. The evaluations were carried out in two moments, first, during the period in which part of the plants were subjected to drought, and second, after these plants were recovered by the return of watering. Were evaluated the chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, RuBisCo carboxylation curve, growth analysis, dry mass accumulation, relative water content, leaf water potential, carbohydrates, chemical profile of sugars, leaf pigments, lipid peroxidation, foliar concentrations of hydrogen peroxide, phenols and proline and activity of antioxidant enzymes. It was concluded that exogenous H_2O_2 application increases the photosynthetic performance of both plants cultivated under normal watering regime and in drought, and metabolic adjustments depend on the number of H_2O_2 applications, as well as exogenous H_2O_2 application increases the biomass production of plants cultivated under irrigation, having acted in the signaling of photosynthetic reactions and protection against water deficit, with potential use for acquired systemic acclimation.

Keywords: reactive oxygen species; acquired systemic acclimation; primary metabolism; growth promotion; osmotic adjustment.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL..... **13**

CAPÍTULO 1 - PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SINALIZA ACLIMATAÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom SOB DÉFICIT HÍDRICO..... **19**

1.1 INTRODUÇÃO..... 19

1.2 RESULTADOS..... 21

1.3 DISCUSSÃO..... 23

1.4 MATERIAL E MÉTODOS..... 29

REFERÊNCIAS..... 33

CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO FOLIAR DE H_2O_2 PROMOVE AJUSTE FOTOQUÍMICO E OSMÓTICO NA ACLIMATAÇÃO DE TOMATEIRO DURANTE A SECA E APÓS RECUPERAÇÃO..... **45**

2.1 INTRODUÇÃO..... 45

2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 47

2.3 RESULTADOS..... 52

2.4 DISCUSSÃO..... 55

REFERÊNCIAS 65

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 79

REFERÊNCIAS..... **81**

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de tomate no Brasil é de relevante importância econômica e social. Segundo dados de CEPEA/ESALQ, (2020), o tomate se destaca entre 60 hortaliças produzidas no país, sendo o fruto mais produzido e o que mais contribui com distribuição de renda nas lavouras. Os valores atrelados a sua comercialização alcançaram 3,5 bilhões de reais em 2019. A produção de tomate é amplamente distribuída no território nacional, sendo aproximadamente 63% destinado ao segmento de mesa, para consumo in natura, e o restante para indústria.

Apesar da expansão do cultivo de tomate em ambiente protegido apresentar possibilidade de controle das condições do ambiente, a maior parte da produção ocorre a campo, onde a cultura depende principalmente da oferta hídrica decorrente de precipitações. Dessa forma, no contexto atual de alterações climáticas, eventos climáticos extremos, como períodos de seca mais prolongada e fora de sua previsibilidade normal devem ocorrer com maior frequência (IPCC, 2022) e estudos que contribuam com alternativas para reduzir prejuízos nas lavouras são de grande relevância.

É fundamental para o desenvolvimento de novas técnicas que possam incrementar o desempenho de plantas cultivadas, o conhecimento do metabolismo da planta e suas respostas a condições ambientais desfavoráveis, como o déficit hídrico, primariamente detectado na raiz, levando por meio da sinalização raiz-folhas, via xilema, ao fechamento estomático, o que reduz a transpiração, mas também a fixação de CO_2, principal dreno de elétrons, acarretando alterações no fluxo de elétrons e no sistema enzimático (SALAZAR; HERNANDEZ; PINO, 2015). A sinalização ocorre principalmente pela ação do hormônio ABA, que induz a primeira resposta fisiológica à seca nas folhas, que é o fechamento estomático e consequente redução da perda de água pela transpiração.

A sinalização pelo ABA nas células guarda ocorre em função da abertura de canais de cálcio e pela liberação de cálcio de reservas internas como do vacúolo. O aumento do cálcio citosólico leva a desativação de bombas protônicas da membrana plasmática e de canais de influxo de potássio, mas ativam canais de efluxo de ânions. Isso acaba levando a despolarização da membrana, que ativa canais de efluxo de

potássio. A continuidade do efluxo de ânions e potássio contribuem para a redução do potencial osmótico externamente às células guarda com consequente movimentação de água e perda de turgor destas células, que leva ao fechamento estomático (SCHROEDER et al., 2001).

A percepção do ABA ocorre por sua ligação aos receptores citosólicos (proteínas PYR/PYL/RCAR), o que inibe por ligação direta proteínas fosfatase do tipo 2C, que são reguladoras negativas da proteína quinase SnRK2 (OST1). Dessa forma, OST1 é ativada, com efeito positivo sobre uma proteína de membrana, a NADPH oxidase (RBOH), que gera H_2O_2 (HSU et al., 2021).

O H_2O_2 desencadeia a abertura de canais iônicos da membrana plasmática que são permeáveis ao cálcio, permitindo sua entrada na célula. O aumento na concentração de cálcio por sua vez leva a ativação de proteínas quinase dependentes de cálcio (CPKs), que também ativam proteinas RBOH e canais de efluxo aniônicos, aumentando o fechamento estomático (HSU et al., 2021). Como a abertura estomática é necessária para o suprimento celular e a consequente transformação do CO_2, fica evidente o impacto nos processos de crescimento da planta, por redução da fotossíntese.

Paralisação do crescimento e outras alterações metabólicas começam a ocorrer quando a seca se prolonga. A seca eleva o nível de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos compartimentos celulares como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Os danos oxidativos podem começar ocorrer caso a eliminação das ERO supere a capacidade do sistema antioxidativo (ISHIBASHI et al., 2011).

Os estudos que contemplam ERO em plantas sob condições de estresse, biótico ou abiótico, normalmente abordam o potencial destrutivo dessas moléculas e suas implicações com dano oxidativo excessivo ou irreparável, no entanto trabalhos mais recentes têm destacado a essencialidade de ERO produzida nos cloroplastos como molécula sinalizadora para inúmeros mecanismos importantes para a manutenção do equilíbrio redox celular necessário para a obtenção e utilização de energia, na fotossíntese e na respiração (FOYER, 2018). A detecção de ERO nos cloroplastos ocorre principalmente por grupos tióis em proteínas como cisteína, e é importante para coordenar as taxas de geração de NADP e ATP com a utilização dessas moléculas nos processos de assimilação fotossintética do carbono, por intermédio de

tioredoxinas. Essa regulação permite respostas rápidas do organismo vegetal as condições ambientais flutuantes, mas outras modificações pós-traducionais são desencadeadas, especialmente reações de fosforilação/desfosforilação de proteínas que também regulam processos que ocorrem nos tilacóides e estroma. Tioredoxinas participam de vias responsáveis pela ativação induzida pela luz de enzimas do ciclo de Calvin-Benson, como frutose 1-6 bifosfatase (FBPase) (FOYER, 2018).

Comumente, a energia recebida nos fotossistemas de plantas sob déficit hídrico excede a capacidade de síntese orgânica, pois a redução na oferta de CO_2 devido ao fechamento estomático limita a fotossíntese e aumenta formas de dissipação da energia, tanto como fluorescência, calor ou drenos alternativos para elétrons (WILHELM; SELMAR, 2011). Outras mudanças no metabolismo incluem maior atividade de enzimas antioxidantes, para combater radicais formados principalmente nos cloroplastos. O acúmulo de prolina e açúcares podem auxiliar na remoção de ERO e atuar como osmorreguladores, e com avanço do período de estresse, é maior o teor de H_2O_2 celular devido a prejuízos na atividade fotossintética e peroxidação de lipídios, com redução na concentração de pigmentos foliares (HATZIG et al., 2014).

Em tomateiros tolerantes a seca, verifica-se que a produção de moléculas que atuam na desintoxicação por ERO é maior. Esse metabolismo especializado tem como principais produtos fenóis e polifenóis (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011), mas também enzimas como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012). A maior concentração de açúcares redutores e prolina nos tecidos de tomateiro submetidos a seca também mostra um mecanismo adaptativo da planta para manter ajuste osmótico (PATANÈ, 2011).

ERO, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto ($^1O_2$) e radical hidroxila (OH) são os principais responsáveis por danos celulares, mas também são importantes moléculas sinalizadoras envolvidas na resposta a eventos estressantes, além de essenciais em processos de desenvolvimento como divisão e diferenciação celular, gravitropismo, crescimento radicular e morte celular programada, entre outros (SINGH et al., 2016). H_2O_2 induz a oxidação de resíduos de cisteína, conhecido interruptor molecular, envolvido em diversas vias de sinalização. Isso leva a formação de dissulfetos mistos com glutationa, que são considerados

formas protetoras de proteínas contra oxidação adicional, modulando as funções das proteínas que interagem com o DNA. A regulação na expressão gênica permite uma resposta rápida sem a necessidade da síntese de novos RNAs mensageiros e sua exportação do núcleo (QURESHI et al., 2022).

O envolvimento de H_2O_2 na sinalização de plantas ao estresse abiótico tem sido estudado, e sugere possibilidade de sua utilização, de forma exógena, no treinamento do metabolismo para eventos futuros, o que é conhecido como aclimatação sistêmica adquirida. Trata-se da preparação da defesa, ou seja, capacidade de resposta mais eficiente ao estresse, após sinalização inicial (CHOI et al., 2017). Segundo Czarnocka; Karpiński, (2018) ERO, embora potencialmente prejudicial às células vegetais, deve ser considerada mensageiro benéfico, que em cooperação com outras moléculas sinalizadoras podem levar a melhor desempenho de culturas em condições desfavoráveis.

Basicamente um estímulo estressante, como alta incidência luminosa, temperatura ou estresse osmótico acarreta sinalização do estresse que é distribuído por toda planta. A planta reage ao estresse com a expressão de genes que levam ao maior funcionamento do metabolismo especializado, como síntese de enzimas e moléculas com ação antioxidante. Essa resposta é aprendida pela planta, e caso um evento subsequente leve ao mesmo tipo de sinalização, o sistema de defesa poderá ser mais efetivo em sua ação, permitindo melhor performance da planta mesmo em condições adversas (CHOI et al., 2017; CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018).

A sinalização, para promover um efeito sistêmico, precisa ser passada de célula para célula, assim como de tecido para tecido no corpo vegetal. O estudo de Gilroy et al., (2014) indica que existe interconexão entre produção de H_2O_2 e os níveis de Ca^{2+} nas células, e a transmissão de sinais deflagrados por algum evento de estresse. Para sinalização a longas distâncias, ondas provocadas apenas por mudanças na concentração dessa ERO e do Ca^{2+} não seriam eficientes, visto que a taxa de difusão de ambos é baixa, e existem diversos mecanismos celulares para remoção dessas moléculas, como agentes antioxidantes e compartimentalização no vacúolo. Dessa forma, a produção de H_2O_2 nas células pode desencadear uma alteração nos níveis citosólicos de Ca^{2+}, provocado principalmente pela ação nos canais carreadores deste íon.

A alteração nos níveis de Ca^{2+} por sua vez age sobre quinases que fazem com que proteínas RBOH (NADPH oxidase), produtora de H_2O_2, aumentem a concentração dessa ERO, em um processo de retroalimentação do circuito. Esses eventos são passados de célula a célula, fazendo com que ocorra uma mudança no potencial de membrana das células, provocando uma onda que pode se propagar de maneira rápida e eficiente.

A sinalização por ERO é um dos mecanismos conhecidos de percepção de estresse pelas plantas, porém as modificações que ocorrerão no metabolismo após essa sinalização ainda não estão elucidadas para as diversas espécies de plantas (SINGH et al., 2016). O H_2O_2, por exemplo, está envolvido no processo de fechamento estomático, intimamente ligado ao status hídrico da planta e do solo. A movimentação estomática é apenas a primeira resposta visual ao déficit hídrico. Ishibashi et al., (2011) verificaram que a aplicação de H_2O_2 em plantas de soja, anteriormente ao déficit hídrico, aumentou a resistência da planta ao estresse subsequente, pelo aumento da concentração de açúcares solúveis nas células, resultando em uma melhor condição hídrica.

Já o estudo de de Azevedo Neto et al., (2005) de Azevedo Neto et al., (2005) mostrou que o H_2O_2 fornecido à plantas de milho posteriormente submetidas ao estresse salino resultou em um melhor desenvolvimento dessas plantas, comparadas àquelas que não receberam o pré-tratamento. Nesse caso, melhor desempenho foi explicado por maior atividade de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD, GPX e APX, que refletiram em menor peroxidação lipídica de componentes celulares. Essas diferenças de respostas metabólicas entre a aplicação de H_2O_2 em plantas indica que ainda há lacunas para entender o papel das ERO nos processos de sinalização e mediação de eventos de estresse.

Plantas cultivadas sob condições hídricas normais, sem estresse aparente, também podem ser beneficiar do fornecimento exógeno de H_2O_2, pois essa molécula é capaz de promover crescimento, como verificaram Jamaludin et al., (2020) e Rashid et al., (2021). Aplicação foliar de 100 µmol de H_2O_2 em plantas de quinoa aumentou condutância estomática, conteúdo de clorofila, carotenóides, antocianinas, acído ascórbico, proteínas solúveis e prolina, enquanto reduziu MDA, o que, segundo os autores resultou em maiores acúmulo de biomassa, produção e qualidade nutricional

de grãos (RASHID et al., 2021). Jamaludin et al., (2020) observaram que aplicação foliar de 15 e 20 mM de H_2O_2 duas vezes por semana durante 45 dias aumentou o crescimento de *Ficus deltoidea* Jack var. Deltoidea, uma planta de crescimento lento, atribuído a baixa taxa fotossintética e sua incapacidade de sobreviver sob luz solar direta. Os autores verificaram que essas doses de H_2O_2 fornecidas aumentaram o desempenho fotossintético da planta, com maior expressão do gene rbcL, de origem do DNA plastídico, que codifica subunidades da enzima RuBisCO, verificada por teste RT-PCR.

H_2O_2 é a espécie reativa de oxigênio mais estável e por isso na planta exerce ação sinalizadora sobre processos como fotossíntese, respiração, translocação e transpiração (ISMAIL et al., 2015). A promoção de crescimento obtida pelo fornecimento de H_2O_2 exógeno é atribuída quase exclusivamente a alterações no metabolismo fotossintético. Segundo revisão de Khan; Yusuf; Fariduddin, (2018), H_2O_2 pode alterar o estado de ativação da RuBisCO e resultar em elevação no rendimento quântico efetivo do FSII. Os autores também compilaram resultados de 14 estudos com fornecimento de H_2O_2 para diversas espécies de plantas, com variação no modo de aplicação (aplicação foliar, via irrigação e tratamento de sementes), com resultados semelhantes quanto ao estímulo do metabolismo fotossintético.

Dessa forma, levantamos a hipótese de que a aplicação exógena de H_2O_2 em tomateiro promove aclimatação em plantas submetidas à seca, e favorece a recuperação após retorno da rega, com redução nos danos causados pela falta de água.

Objetivou-se neste trabalho verificar se a aplicação foliar de H_2O_2 interfere no desempenho fotossintético, produção de biomassa e no ajuste metabólico de tomateiro submetido à período de seca e posterior recuperação.

CAPÍTULO 1

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SINALIZA ACLIMATAÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom SOB DÉFICIT HÍDRICO[1]

O contexto atual de mudanças climáticas impõe a necessidade de desenvolvimento de estratégias que possam reduzir os impactos do déficit hídrico para garantir a sustentabilidade de práticas agrícolas. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atua na sinalização de plantas podendo induzir respostas metabólicas de defesa frente a condições desfavoráveis como seca. Este estudo investigou se a aplicação foliar de H_2O_2 influencia o desempenho fotossintético, a produção de biomassa e o ajuste metabólico de plantas de tomate submetidas ou não a período de déficit hídrico e recuperação. O estudo foi realizado em esquema fatorial e testou plantas submetidas a duas condições hídricas (plantas regadas e plantas submetidas ao déficit hídrico), e aplicação foliar de 1mM H_2O_2 (zero, uma ou duas aplicações, 24 horas após a primeira) e avaliadas em dois momentos, no período do déficit e após recuperação. Verificamos que a aplicação foliar de H_2O_2 pode ser considerada no manejo de tomateiro como forma de promover aclimatação perante eventos de seca ou melhorar o desempenho fotossintético de plantas em capacidade de campo.

1.1 INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é um dos principais fatores abióticos de estresse que acarreta perdas na agricultura[1] e no contexto atual de alterações climáticas estratégias para reduzir o impacto do déficit hídrico são importantes para a sustentabilidade da prática agrícola.

O tomateiro é um dos vegetais mais cultivados no mundo, presente em todos os continentes, com área colhida em 2021 superior a 5 milhões de hectares[2]. Apesar da expansão do cultivo de tomate em ambiente protegido apresentar possibilidade de controle das condições do ambiente, a maior parte da produção ocorre a campo, onde a cultura depende principalmente da oferta hídrica decorrente de precipitações.

O estresse por seca em plantas é bem relatado na literatura, e provoca alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas que acarretam redução no crescimento vegetal. O reconhecimento do estresse envolve aumento na produção de diversas moléculas sinalizadoras, como espécies reativas de oxigênio (ERO), mas que em alta concentração são responsáveis por danos oxidativos nas membranas celulares. Outra mudança verificada é o aumento na concentração de etileno, conhecido como hormônio do estresse, que interfere nos processos fisiológicos das plantas, aumentando a respiração celular, causando degradação de pigmentos fotossintéticos, entre outros[3]. ERO e etileno no entanto estão envolvidos no aumento da tolerância de tomate ao estresse salino induzido por brassinosteróides (BR)[4].

Os cloroplastos, que contém pigmentos fotossintéticos para captação da energia luminosa necessária para síntese orgânica, é também grande produtor de ERO, especialmente nas condições iluminadas em que há reduzida oferta de CO_2[5]. A energia recebida nos fotossistemas de plantas sob déficit hídrico excede a capacidade de síntese orgânica, pois a redução na oferta de CO_2 devido ao fechamento

[1] Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Scientific Reports

estomático limita a fotossíntese e aumenta formas de dissipação da energia, tanto na forma de fluorescência, calor ou drenos alternativos para elétrons, como fotorrespiração [6–8]. Outras mudanças no metabolismo incluem aumento em pigmentos foliares acessórios, que auxiliam na dissipação do excesso de energia e na remoção de ERO e acúmulo de açúcares solúveis, que atuam como osmorreguladores. Com avanço do período de estresse, mais ERO são formadas, devido a prejuízos na atividade fotossintética e peroxidação de lipídios com redução na concentração de clorofilas [5].

Embora consideremos que a produção excessiva de ERO nas plantas sob condições de estresse seja responsável pelos maiores danos que levam a prejuízo no crescimento, a produção dessas moléculas nos cloroplastos é essencial para o estabelecimento de uma ampla rede de conexões que permite o funcionamento e o equilíbrio das propriedades redox nessas organelas. Além disso, muitas proteínas são ativadas por processos oxidativos, o que constitui forma eficiente de sinalização especialmente para processos regulatórios na assimilação de CO_2[9].

A sinalização por ERO não ocorre apenas a nível de cloroplastos, e para promover um efeito sistêmico, precisa ser transmitida de célula para célula, assim como de tecido para tecido no corpo vegetal. H_2O_2, por ser mais estável é a principal ERO atuante nos processos de sinalização. O estudo de Gilroy et al.[10] indica que existe interconexão entre produção de H_2O_2 e os níveis de Ca^{2+} nas células. A alteração nos níveis de Ca^{2+} age sobre quinases que fazem com que proteínas RBOH (NADPH oxidase), produtora de H_2O_2, aumentem a concentração dessa ERO, em processo que promove a manutenção do sinal. Esses eventos são passados de célula a célula, fazendo com que ocorra uma mudança no potencial de membrana das células, provocando uma onda que pode se propagar de maneira rápida e eficiente. Este mecanismo é fundamental para o reconhecimento do estresse, rápida sinalização às condições ambientais flutuantes e respostas de proteção.

O envolvimento de H_2O_2 na sinalização de plantas ao estresse abiótico sugere possibilidade de sua utilização, de forma exógena, de modo a provocar alteração no metabolismo e auxiliar aclimatação[10,11]. Trata-se da preparação da defesa, ou seja, capacidade de resposta mais eficiente ao estresse, após sinalização inicial[12]. H_2O_2 induz a oxidação de resíduos de cisteína, conhecido interruptor molecular, envolvido em diversas vias de sinalização. Isso leva a formação de dissulfetos mistos com glutationa, que são considerados formas protetoras de proteínas contra oxidação adicional, modulando as funções das proteínas que interagem com o DNA. A regulação na expressão gênica permite uma resposta rápida sem a necessidade da síntese de novos RNAs mensageiros e sua exportação do núcleo[13].

O fornecimento exógeno de H_2O_2 via foliar em plantas submetidas ao estresse por seca já se mostrou benéfico em outras culturas, como soja [14], permitindo maior desenvolvimento da planta. No entanto, plantas cultivadas sob condições hídricas normais também podem ser beneficiadas pela aplicação de H_2O_2, com estímulo ao crescimento, como demonstraram Jamaludin et al[15]. Ampla faixa de concentração de H_2O_2 é relatada para aclimatação à estresse por fatores ambientais, variando entre 0,05 µM e 200 mM, para diferentes espécies vegetais[13].

Dessa forma, levantamos a hipótese de que aplicação exógena de H_2O_2 em concentração adequada pode acarretar alterações metabólicas em plantas de tomateiro cultivadas sob regime normal de rega e sob déficit hídrico, proporcionando maior crescimento e redução nos danos causados pela falta de água.

Objetivou-se neste trabalho verificar se a aplicação exógena de H_2O_2 promove ajuste no metabolismo fotossintético para aclimatação de tomateiro submetido ou não à período de déficit hídrico e recuperação.

1.2 RESULTADOS

1.2.1 Aplicação foliar de H_2O_2 aumentou V_{cmax} de plantas independente da condição hídrica, e manteve *J* e *TPU* de plantas submetidas ao déficit hídrico em valores semelhantes às plantas regadas

Plantas regadas que receberam H_2O_2 apresentaram maior V_{cmax} aos 9 DAA (Figura 1a), com elevação em aproximadamente 60% em relação plantas sem H_2O_2 e na segunda avaliação, apenas plantas 1x H_2O_2 mantiveram maior V_{cmax} (Figura 1b). Em plantas submetidas ao déficit hídrico, aplicação de 2x H_2O_2 aumentou V_{cmax} em aproximadamente 6 vezes em relação as plantas que não receberam H_2O_2 (Figura 1a).

Aplicação de H_2O_2 em plantas regadas não modificou *J* e *TPU* aos 9 DAA (Figura 1c,e), no entanto, verificou-se maiores *J* e *TPU* nas plantas que receberam 1x H_2O_2 aos 23 DAA (Figura 1d,f). Em plantas submetidas ao déficit hídrico, aplicação de H_2O_2 dobrou valores de *J* e *TPU* em relação as plantas sem H_2O_2 aos 9 DAA, mas não foi observado diferença aos 23 DAA.

1.2.2 Aplicação foliar de H_2O_2 promoveu crescimento de plantas regadas e paralisou crescimento de plantas submetidas a seca quando fornecido 2x H_2O_2, mas manteve maior CRA nessas plantas

Aplicação foliar de H_2O_2 em tomateiro promoveu alterações no crescimento das plantas, especialmente em plantas regadas que receberam 1x H_2O_2, que apresentaram crescimento mais rápido, observado por queda antecipada na taxa assimilatória líquida (Figura 2a) e maior massa seca (Figura 3a, b) , e nas plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam 2x H_2O_2, que apresentaram crescimento lento, observado por taxa assimilatória líquida e taxa de crescimento relativo praticamente constante ao longo das épocas avaliadas (Figura 2a,b), resultado oposto aos demais tratamentos.

Plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam H_2O_2 apresentaram maior CRA aos 12 DAA (Figura 3c), auge do déficit, e aos 14 DAA, logo após retorno da rega (Figura 3d), plantas que receberam 2x H_2O_2 apresentaram CRA semelhante às plantas regadas.

1.2.3 Plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram redução em Fv/Fm, entretanto aplicação foliar de H_2O_2 promoveu mecanismo de fotoproteção

Plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram menor eficiência quântica máxima do fotossistema II adaptada ao escuro (Fv/Fm) aos 12 dias após aplicação dos tratamentos foliares (DAA), com Fv/Fm de aproximadamente 0,75 contra 0,80 em plantas regadas (Figura 4a). Aos 14 DAA, logo após o retorno da rega, plantas recuperadas não diferiram das regadas e aos 19 DAA plantas que receberam H_2O_2 apresentaram discreta redução em Fv/Fm (Figura 4b,c).

Plantas sem H_2O_2 submetidas ao déficit hídrico apresentaram maior fluorescência mínima adaptada ao escuro (Fo) do que plantas controle regadas, aos 12 DAA (Figura 4d). No mesmo período, plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam H_2O_2 apresentaram menor Fo em relação às demais. Aos 14 DAA, plantas sem H_2O_2 recuperadas continuaram com maior Fo em relação às plantas sem H_2O_2 regadas (Figura 4e).

Aos 12 DAA, plantas que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior NPQ entre as regadas, e plantas 2x H_2O_2 apresentaram menor NPQ entre plantas submetidas ao déficit hídrico (Figura 4g). Após retorno da rega, aos 14 DAA, plantas 2x H_2O_2 recuperadas continuaram com menor NPQ (Figura 4h) e aos 19 DAA menor NPQ foi verificado em plantas 1x H_2O_2 recuperadas (Figura4i).

1.2.4 Aplicação foliar de H_2O_2 modificou fotorrespiração e respiração diária independente da condição hídrica

Plantas que receberam 2x H_2O_2 apresentaram maior fotorrespiração aos 9 DAA (Figura 5a), enquanto aos 23 DAA plantas regadas ou recuperadas que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior fotorrespiração (Figura 5b). A respiração diária (R_d) foi menor aos 9 DAA em plantas que receberam 1x H_2O_2 (Figura 5c). Aos 23 DAA, plantas regadas que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior R_d, assim como plantas recuperadas que receberam 2x H_2O_2 (Figura 5d).

1.2.5 Aplicação foliar de H_2O_2 aumentou teor de açúcares redutores e sacarose em plantas submetidas ao déficit hídrico

De modo geral, plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais, redutores e sacarose do que plantas regadas, aos 12 DAA, com exceção para sacarose nas plantas que não receberam H_2O_2 (Figura 6a,c,e). No mesmo período, fornecimento de 2x H_2O_2 aumentou o teor de amido em plantas regadas (Figura 6g). Aos 24 DAA, plantas recuperadas continuaram apresentando maior teor de açúcares solúveis totais, redutores e sacarose que plantas regadas (Figura 6b,d,f), enquanto o fornecimento de H_2O_2 reduziu o teor de amido das plantas (Figura 6h).

1.2.6 Aplicação foliar de H_2O_2 aumentou concentração de clorofila *a* e pigmentos acessórios em plantas regadas e em plantas submetidas ao déficit hídrico

Plantas regadas que receberam 2x H_2O_2 apresentaram maior concentração de clorofila *a*, assim como plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam 1x H_2O_2, aos 12 DAA (Figura 7a). Nesse período, de modo geral, aplicação de H_2O_2 aumentou concentração de pigmentos acessórios clorofila *b*, antocianina e carotenoides (Figura 7c,e,g). Aos 23 DAA, plantas recuperadas apresentaram maior concentração de clorofilas *a* e *b* do que plantas regadas, exceto quando fornecido 2x H_2O_2 (Figura 7b,d).

1.2.7 Mapa de calor mostrou que aplicação foliar de 2x H_2O_2 modificou as respostas metabólicas de forma mais pronunciada, e após retorno da rega, plantas recuperadas 2x H_2O_2 apresentaram respostas com maior semelhança às plantas sem H_2O_2 regadas

No período de déficit hídrico, o mapa de calor formou dois clusters principais distintos, entre plantas regadas e plantas sob déficit hídrico (Figura 8a). Entre plantas das duas condições hídricas, houve subdivisão do cluster indicando menor similaridade nas respostas metabólicas para plantas que receberam 2x H_2O_2. Destacam-se a influência da aplicação de H_2O_2 entre plantas submetidas ao déficit para redução de Fo e aumento do teor de açúcares redutores, e entre as plantas regadas, influência positiva em *J* e acúmulo de MS, para plantas 1x H_2O_2 e 2x H_2O_2, respectivamente.

No período de plantas recuperadas, formou-se dois clusters principais (Figura 8b). O primeiro subdividiu-se agrupando plantas recuperadas, sem H_2O_2 ou 1x H_2O_2. A subdivisão do segundo cluster agrupou plantas recuperadas que receberam 2x H_2O_2 e plantas regadas sem H_2O_2, com menor similaridade nas respostas para plantas regadas que receberam aplicação de 1x H_2O_2 e 2x H_2O_2. De modo geral, as plantas regadas que receberam H_2O_2 apresentaram tendência positiva em V_{cmax}, *J* e amido e negativa para açúcares solúveis totais, redutores e sacarose. Plantas regadas sem H_2O_2 e plantas recuperadas que receberam 2x H_2O_2 apresentaram tendência positiva na fotorrespiração e negativa para amido e açúcares solúveis totais, e plantas recuperadas sem H_2O_2 e 1x H_2O_2 indicaram tendência positiva para açúcares solúveis totais, redutores e carotenoides.

1.3 DISCUSSÃO

Aplicação foliar de H_2O_2 em plantas de tomate provocou alteração no metabolismo fotossintético de plantas de tomate independente da condição hídrica. Esse trabalho mostra que H_2O_2 exógeno pode ser utilizado para ajuste do metabolismo de tomateiro, aumentando a taxa de carboxilação da RuBisCO e proporcionando maior crescimento de plantas regadas e modificando vias de

fotoproteção com menor perda de recursos hídricos, demonstrado pelo CRA, em plantas submetidas ao déficit hídrico. Aplicação sequencial de H_2O_2 (2x H_2O_2) proporcionou respostas metabólicas que induziram proteção especialmente em plantas submetidas ao déficit hídrico. Nessas plantas a fotorrespiração, complementar à fluorescência e ao calor (NPQ) para remoção do excesso de energia nos fotossistemas, foi importante para recuperação da foto inibição no auge do déficit. O retorno da rega desencadeou respostas metabólicas semelhantes àquelas das plantas regadas que não receberam H_2O_2 (Figura 8b).

Aplicação foliar de H_2O_2 aumentou V_{cmax} de plantas de tomate (Figura 1a,b), o que também foi verificado em outras espécies, e atribui-se a capacidade do H_2O_2 em alterar o estado de ativação da Rubisco [16]. Em trabalho mais recente Jamaludin et al.[15] confirmaram que aplicação exógena de H_2O_2 aumentou a expressão do gene rbcL de origem do DNA plastídico, subunidade da RuBisCO, verificado por PCA em *F. deltoideae* e promoveu a fotossíntese . Segundo os autores, H_2O_2 regula a expressão de genes através da oxidação de proteínas, assim como ativação de quinases e regulação de cascatas de transdução.

Outro benefício da aplicação foliar de H_2O_2 na dinâmica do processo fotossintético pode ser verificado em *J* e *TPU,* especialmente nas plantas em déficit hídrico. O déficit hídrico reduziu *J* e *TPU*, mas a redução foi atenuada com o fornecimento de H_2O_2 (Figura 1c,e). Em plantas sob déficit hídrico moderado, o principal evento limitante para a fotossíntese é o fechamento estomático que limita a concentração de CO_2 disponível para o processo. Com menor concentração de CO_2, sua assimilação diminui induzindo redução da atividade da enzima sacarose fosfato sintase[17], que pode ser relacionada a redução na *TPU*.

Segundo Sharkey[18], limitação em *TPU* imposta por redução da capacidade do dreno, como remoção de estrutura reprodutiva gera acúmulo de sacarose e feedback negativo para fotossíntese. Pode-se supor que a condição de déficit hídrico também limite a força de drenos, com redução da capacidade de crescimento e necessidade de ajuste osmótico. Nesse sentido maior *TPU* pode estar relacionado ao maior acúmulo de açúcares redutores e sacarose (Figura 6c-f), o que pode refletir na manutenção dos recursos hídricos, observado pelo maior CRA nas plantas sob déficit hídrico que receberam aplicação de H_2O_2 (Figura 3c-e), e que está de acordo com maior atividade da enzima sacarose fosfato sintase verificada no trabalho de Ozaki et al.[19] após fornecimento de H_2O_2 para plantas de *Cucumis melo*.

Aos 23 DAA apenas plantas regadas que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior *J* (Figura 1d) o que pode indicar maior atividade de enzimas do ciclo de Calvin-Benson (além da RuBisCO) e formação de trioses fosfato com rápida regeneração do substrato RuBP [20]. De outra forma, limitação em *J* pode ser devido à redução na eficiência da fase bioquímica da fotossíntese, mas também é verificada quando a intensidade luminosa excede a capacidade de fotossíntese, o que resulta em aumento na fotorrespiração e maior geração de ERO como H_2O_2.

Como verificado no trabalho de Charles e Halliwell[21] em cloroplastos isolados, alta concentração de H_2O_2 nas organelas pode alterar o estado redox da enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBPase), importante enzima do ciclo de Calvin-Benson, oxidando-a e tornando-a inativa, reduzindo portanto a taxa de formação de trioses fosfato e regeneração de RuBP. O fornecimento de 2x H_2O_2 pode ter reduzido a atividade da FBPase por interferência da aplicação exógena e maior produção endógena de H_2O_2 devido maior fotorrespiração observada aos 12 DAA, o que limitou *J* (Figura 1d).

Aplicação foliar de H_2O_2 em plantas regadas proporcionou crescimento mais rápido e maior acúmulo de massa. Isso pode ser observado de maneira mais pronunciada nas plantas regadas que receberam 1x H_2O_2, pois a taxa assimilatória líquida teve queda mais acentuada a partir do décimo sexto DAA (Figura 2a). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes em diferentes espécies vegetais nos quais o fornecimento exógeno de H_2O_2 exerceu ação de promoção de crescimento[15,22]. Neste estudo, verificou-se maior MST em plantas regadas que receberam H_2O_2 (Figuras 2g e 3a), o que pode ser devido a ação sinalizadora sobre enzimas relacionadas à fotossíntese, especialmente RuBisCO, conforme também mostrou o trabalho de Jamaludin et al.[15]

Aplicação foliar de 2x H_2O_2 em plantas submetidas ao déficit hídrico resultou em crescimento lento, com TAL e TCR praticamente constantes (Figura 2a,b). No período inicial de crescimento, elevada TAL e TCR são esperados para formação de área foliar, mas ao longo do ciclo, com o auto sombreamento, desenvolvimento de tecidos não fotossintetizantes e frutificação, esses índices são reduzidos, indicando alteração nas estruturas preferenciais e da relação fonte-dreno[23]. Dessa forma aplicação de 2x H_2O_2 em plantas submetidas a período de déficit hídrico alterou a dinâmica de crescimento, assim como a ordem preferencial para investimento dos fotoassimilados, nesse caso mais retidos nas folhas, resultados confirmados pelo PEF e RMF (Figura 2d,f).

Doze dias após suspensão da rega, plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram menor Fv/Fm em relação as plantas regadas (Figura 4a). Segundo Cao et al.[24], plantas sob estresse por seca apresentam redução em Fv/Fm decorrente de danos no fotossistema, pelo excesso de energia que não pode ser utilizada na fase bioquímica da fotossíntese, devido redução da disponibilidade de CO_2 pelo fechamento estomático, com aumento na fotorrespiração. Essa condição acarreta geração de ERO, responsáveis por peroxidação de membranas que são essenciais ao processo fotossintético. Dois dias após o retorno da rega, não houve variação em Fv/Fm, indicando plena recuperação das plantas, e na última avaliação, aos 19 DAA, menor Fv/Fm das plantas regadas que receberam H_2O_2 ocorreu devido a auto sombreamento pelo crescimento rápido e maior acúmulo de massa (Figura 2b,c).

Entre as plantas que não receberam H_2O_2, observamos que as submetidas ao déficit hídrico apresentaram elevação em Fo em relação as regadas (Figura 4d). Estudo de Cao et al.[24], com tomateiro submetido ao déficit hídrico revelou menor Fo nos primeiros dias de déficit, mas com o avanço do período de estresse, Fo aumentou e permaneceu maior que o controle regado até o final do estresse. Segundo Cao et al. e Demmig et al.[24,25] plantas estressadas por seca frequentemente apresentam acréscimo em Fo, resultado de dano no fotossistema causado por ERO, com dissociação irreversível da clorofila do complexo proteico coletor de luz do PSII e da inativação reversível do centro de reação do PSII.

No presente estudo, plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam H_2O_2 apresentaram menor Fo no auge do déficit (Figura 4d), o que pode indicar mecanismo de fotoproteção, pelo aumento na taxa de dissipação não radiativa de energia, através da sua transferência para outras moléculas de elevado potencial energético, protegendo os componentes das membranas dos tilacóides. Essa resposta foi verificada em *Hedera helix* L., assim como aumento no nível do carotenoide zeaxantina que preveniu foto inibição em condição de excesso de luz e baixa concentração de CO_2 [25]. Após o retorno da rega, Fo de plantas recuperadas que não receberam H_2O_2 novamente foi maior que nas plantas que receberam aplicação de

H_2O_2 (Figura 4e), o que pode indicar necessidade de dissipação de energia na forma de fluorescência como forma de evitar danos nos fotossistemas.

Plantas submetidas à seca frequentemente apresentam maior NPQ, o que não foi observado nesse estudo, provavelmente devido ao direcionamento de energia para outras vias de fotoproteção (Figura 4g). NPQ é um processo fotoprotetor que leva à dissipação do excesso de energia na forma de calor, reduzindo a energia potencial para produção de espécies reativas, competindo com extinção por fluorescência e bioquímica[26]. NPQ é sinalizado pela acidificação do lúmen do tilacóide e ocorre especialmente quando há aumento no transporte cíclico de elétrons que resulta em grande produção de prótons. Dentre as mudanças envolvidas estão a conversão de violaxantina em zeaxantina no ciclo da xantofila, carotenoide importante na dissipação via NPQ. Neste estudo, verificamos que plantas regadas que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior NPQ (Figura 4g) e maior concentração de carotenoides (Figura 7g).

A fotorrespiração é outro recurso importante para fotoproteção de plantas sob déficit hídrico, e aplicação de 2x H_2O_2 aumentou a utilização dessa via (Figura 5a). Segundo Lima Neto et al.[27], a fotorrespiração é essencial para plantas C3, pois se vale da dupla funcionabilidade carboxilase/oxigenase da Rubisco para manutenção da integridade dos fotossistemas em condições iluminadas com baixa disponibilidade de CO_2. Os produtos da função oxigenase da Rubisco são uma molécula de 3 – fosfoglicerato e uma de 2 – fosfoglicolato, em série de reações que envolvem cloroplasto, peroxissomo e mitocôndria e liberam CO_2 e NH_3. Nessas plantas, a energia utilizada para a conversão de 2- fosfoglicolato em 3- fosfoglicerato para regeneração da RubP pode explicar a paralisação do crescimento, uma vez que os recursos fotossintéticos podem ter sido direcionados para superação do estresse.

R_d também foi alterada pelo fornecimento de H_2O_2. Durante o déficit hídrico, redução em R_d nas plantas que receberam 1x H_2O_2 (Figura 5c) possivelmente auxiliou na manutenção do status hídrico das plantas permitindo maior acúmulo de carboidratos solúveis, e nas plantas regadas um balanço de carbono mais positivo que resultou em maior crescimento. Na segunda avaliação, maior R_d em plantas regadas que receberam 1x H_2O_2 (Figura 5d) pode indicar maior necessidade de ATP para síntese de sacarose, como observado por maior *TPU*. Durante o dia, o metabolismo de plantas iluminadas precisa coordenar e atender as demandas energéticas das células, desse modo, cloroplastos e mitocôndrias trabalham em consonância de acordo com as mudanças ambientais. Assim compostos orgânicos produzidos pela fotossíntese são oxidados pela respiração para produção de ATP e agentes redutores, que suprem energeticamente as células [7].

Plantas recuperadas que receberam 2x H_2O_2 também apresentaram maior R_d (Figura 5d), o que pode ter reduzido o acúmulo de açúcares solúveis totais e amido (Figuras 6h e 8b). Além disso, em condições ambientais adversas que prejudiquem a fotossíntese, como seca, a respiração pode metabolizar o excesso de energia redutora gerada nos fotossistemas, em vias alternativas, sendo importante no fornecimento de energia para recuperação da planta [28]. Plantas de tomate apresentaram maior tolerância ao estresse salino com envolvimento de H_2O_2 e etileno induzidas por brassinosteróides. O acúmulo de etileno aumentou a utilização da via oxidase alternativa que promoveu tolerância ao estresse[4].

Plantas sob déficit hídrico apresentaram maior concentração de açúcares solúveis totais (Figura 6a), o que é resposta comum do organismo vegetal contra a desidratação celular, e reflete ajuste osmótico para manutenção dos recursos hídricos nas folhas [29]. Nessas plantas, aplicação de 1x H_2O_2 aumentou a concentração de

açúcares redutores, enquanto 2x H_2O_2 resultou em maior concentração de sacarose (Figura 6c,e). Resultados semelhantes foram observados no estudo de Ozaki[19], em que fornecimento de H_2O_2 proporcionou maior acúmulo de frutose, glicose e sacarose em *C. melo*. Os autores argumentam que a maior atividade verificada de enzimas relacionadas à síntese de açúcares, como a sacarose fosfato sintase, foi responsável por esse resultado. Como observado anteriormente neste trabalho, plantas que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram maior *TPU*, concordando com os resultados relatados. Nas plantas sob déficit hídrico que receberam 2x H_2O_2, a maior concentração de sacarose (Figuras 6e e 8a) também foi resultado da menor taxa de crescimento dessas plantas, com redução da força dos drenos e acúmulo do carboidrato nas folhas.

Em plantas sob déficit hídrico, a necessidade de ajuste osmótico provoca alterações na alocação do carbono, com redução no acúmulo de amido para conversão em moléculas solúveis, com menor peso molecular. Esses açúcares, como é o caso da glicose e frutose, podem ser utilizados como fonte de energia para processos celulares, como bloco construtor para biossíntese de compostos especializados e osmoprotetores e atuar como molécula sinalizadora para a expressão de genes relacionados a defesa vegetal [29,30]. Plantas que receberam 1x H_2O_2 e apresentaram maior concentração de açúcares redutores podem ter utilizado os processos protetores acima registrados (Figura 6c).

Nas plantas regadas, fornecimento de 1x H_2O_2 reduziu a concentração de sacarose aos 12 DAA, o que está de acordo com a maior TAL verificada (Figuras 6e e 2a). A exportação de sacarose dos tecidos fontes para os drenos com alta atividade metabólica mantém baixa a concentração foliar do carboidrato, que quando retido em maiores concentrações pode produzir feedback negativo para a fotossíntese [31].

Nas plantas regadas que receberam 2x H_2O_2 no entanto, foi verificado aumento no teor de amido (Figura 6g), resultado semelhante ao verificado no estudo de Ozaki et al.[19] em folhas de meloeiro por ocasião do fornecimento exógeno de H_2O_2. Os autores sugerem que H_2O_2 pode ser um fator chave para regulação do ciclo de Calvin-Benson e metabolismo do açúcar, especialmente alterando a atividade de enzimas como FBPase e sacarose fosfato sintase. Como discutido anteriormente, é possível que altas concentrações de H_2O_2 reduzam atividade da enzima FBPase, e essa alteração pode favorecer o acúmulo de amido nas folhas.

Aos 24 DAA, plantas recuperadas apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose (Figura 6b,d,f) o que pode ser resultado do menor crescimento verificado nessas plantas e ajustes metabólicos ainda necessários para total recuperação do período de déficit hídrico. A redução na concentração de amido foi verificada apenas nas plantas que receberam H_2O_2 (Figura 6h), o que pode indicar que essas plantas podem ter se beneficiado da maior concentração desses açúcares solúveis resultando em melhor aproveitamento dos recursos hídricos e sinalização para crescimento.

O déficit hídrico causou redução na concentração de pigmentos foliares nas plantas de tomate, devido aumento na concentração de ERO, que acarreta danos oxidativos, e aumento na produção de etileno, que ativa quilase causando degradação de moléculas de clorofila[3,5], o que também foi verificado em nosso estudo (Figura 7a). Além do déficit hídrico, aplicação foliar de H_2O_2 modificou a concentração de pigmentos foliares, com maior teor de clorofila *a* observada nas plantas regadas que receberam 2x H_2O_2, e nas plantas submetidas ao déficit hídrico que receberam 1x H_2O_2 (Figura 7a). Maiores concentrações de clorofila *a* e *b* em plantas que receberam aplicação de H_2O_2 foram relatadas em outros estudos. Habib et al.[32] observaram que

H_2O_2 aplicado em trigo submetido a déficit hídrico aumentou clorofilas *a* e total, e atribuíram esse resultado a maior atividade de enzimas antioxidantes, enquanto Jamaludin et al.[15] observaram incremento de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em *F. deltoidea* com aplicação semanal de H_2O_2, em condições hídricas normais. Nurnaeimah et al.[33] explicam que H_2O_2 ajuda a proteger as células das folhas contra a senescência, mas em baixas concentrações leva a aceleração na degradação da clorofila, devido ativação de uma peroxidase do H_2O_2. Dessa forma, dependendo do estado hídrico, aplicação foliar de 1x ou 2x H_2O_2 pode resultar em proteção da ultraestrutura de cloroplastos, permitindo maior concentração de pigmentos fotossintéticos.

O aumento na clorofila *b*, antocianinas e carotenoides (Figura 7c,e,g) também ajuda a explicar a maior concentração de clorofila *a* observada, pois são úteis na dissipação do excesso de energia preservando a integridade dos fotossistemas. Antocianina, é pigmento relacionado a defesa vegetal, com função antioxidante contra ERO além de apresentar propriedade de filtragem de luz que reduze a quantidade de energia que chega ao fotossistema. Acúmulo de antocianina também foi relacionado ao desencadeamento de funções protetoras em plantas de tabaco sob déficit hídrico, com modificação no metabolismo de carboidratos, garantindo maior CRA[34], resultado semelhante ao observado nesse estudo nas plantas sob déficit hídrico que receberam aplicação de H_2O_2 (Figura 7e).

Aumento nos carotenoides verificado nas plantas que receberam H_2O_2 pode indicar resposta metabólica com benefícios na proteção dos fotossistemas o que auxiliou maior crescimento das plantas regadas. O envolvimento dos carotenoides na regulação do excesso de energia ocorre primeiramente por alterações conformacionais na proteína PsbS, localizada no lúmen do tilacóide, que se torna protonada devido redução no pH do meio. Ao mesmo tempo, a enzima deepoxidase se torna ativa e conduz a redução de violaxantina em zeaxantina, que se liga a PsbS. Essa ligação resulta em contato do carotenoide com o centro coletor de luz (LHC), e a energia é direcionada da clorofila para zeaxantina, que é eficiente em sua dissipação por radiação térmica[6].

Aos 24 DAA, plantas recuperadas que não receberam H_2O_2 ou que receberam 1x H_2O_2 apresentaram maior concentração de pigmentos foliares em relação as plantas regadas (Figura 7b,d,h). Conforme descrito anteriormente, H_2O_2 tem papel fundamental na proteção dos cloroplastos, e seu fornecimento pode permitir maior concentração de pigmentos foliares. Suspeitamos que o déficit hídrico teve potencial para desencadear sinalização por H_2O_2 após a recuperação, assim como aplicação de 1x H_2O_2 foi adequado para manutenção desse sinal. No entanto, o fornecimento de 2x H_2O_2 parece ter desencadeado reação para remoção dessa ERO resultando em concentrações de clorofila *a* e carotenoides similares às plantas regadas (Figura 7b,h). Outra hipótese é que plantas recuperadas que receberam aplicação de 2x H_2O_2 podem ter acumulado mais etileno, com degradação da clorofila[3], e estimulou maior R_d o que pode relacionado com a utilização de vias respiratórias alternativas induzidas por acúmulo de etileno[4].

Demonstramos nesse trabalho que aplicação foliar de 1 mM de H_2O_2 contribuiu com o ajuste fotossintético, levando a aclimatação por meio da utilização de drenos alternativos para dissipação de energia não fotoquímica em plantas submetidas ao déficit hídrico, especialmente quando aplicado de modo sequencial (2x H_2O_2). Nas plantas regadas, 1x H_2O_2 resultou em aumento de massa seca, o que permite sugerir sua atuação como promotor de crescimento. Desse modo, a aplicação foliar de H_2O_2 pode ser considerada no manejo de tomateiro como forma de promover aclimatação

perante eventos de seca ou melhorar o desempenho fotossintético de plantas em capacidade de campo.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Local e cultivo

O experimento foi realizado entre outubro/2020 e dezembro/2020, em casa de vegetação Van der Hoeven do tipo pad fun, com temperatura entre 25± 5 C, localizada na área experimental do departamento de Biodiversidade e Bioestatística da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". A coordenada geográfica é 22° 53′ 09″W e 48° 26′ 42″ S e altitude média de 800 m. As condições ambientais verificadas durante a condução do experimento foram densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 836 ± 200 µmol m^2 s^{-1}, umidade relativa do ar de 43 ± 10% e concentração ambiental de CO_2 de 410 ± 5 µmol mol^{-1}.

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom subtipo selvagem) obtidas por semeadura em bandeja e substrato vermiculita, foram utilizadas como modelo. Doze dias após a emergência as plântulas foram selecionadas e transplantadas para vasos individuais de 1 dm^3, contendo 130 g de vermiculita como substrato. As plantas foram fertilizadas a cada dois dias com solução nutritiva nº 2 [35], inicialmente a 25% da força iônica, e após sete dias a 50%. No dia 19 de novembro, por ocasião do florescimento (45 dias após semeadura), deu-se o início aos tratamentos.

1.4.2 Delineamento experimental, aplicações dos tratamentos, imposição de déficit hídrico e recuperação após retorno da rega

Para estudar as repostas de tomateiro ao fornecimento exógeno de H_2O_2 em duas condições de cultivo (sem período de déficit hídrico e com período de déficit hídrico), o experimento consistiu em dois ensaios conduzidos sincronicamente, delineados em fatorial 2x3 com quatro repetições. O primeiro ensaio compreendeu plantas regadas e plantas submetidas ao déficit hídrico, que receberam aplicações foliares de água (sem H_2O_2), uma aplicação de H_2O_2 (1x H_2O_2) ou duas aplicações de H_2O_2 (2x H_2O_2). O segundo ensaio foi conduzido da mesma forma que o primeiro, mas teve sequência com a recuperação das plantas submetidas ao déficit, pelo retorno da rega (plantas regadas e plantas recuperadas, sem H_2O_2, 1x H_2O_2 ou 2x H_2O_2).

O experimento iniciou-se com a aplicação dos tratamentos de H_2O_2. Plantas sem H_2O_2 foram pulverizadas com solução composta de água deionizada + adjuvante não iônico, plantas 1x H_2O_2 foram pulverizadas com água deionizada + adjuvante não iônico + 1 mM de H_2O_2 e plantas 2x H_2O_2 receberam duas pulverizações com água deionizada + adjuvante não iônico + 1 mM de H_2O_2 (intervalo de 24 horas entre aplicações). Utilizou-se peróxido de hidrogênio estabilizado 30% BAKER™. Todas as plantas foram pulverizadas duas vezes, conforme tratamento. A aplicação foliar foi realizada com auxílio de pulverizador costal pressurizado de CO_2, com ponta do tipo

cônica cheia, e utilizada pressão de 0,3 kgf por 31 cm^2, sendo aplicado aproximadamente 8 mL da solução por planta.

Após as aplicações foliares, as plantas regadas receberam apenas água a cada dois dias durante todo o período de avaliação. O fornecimento de água sempre foi realizado até sua percolação e drenagem natural do substrato, enquanto plantas submetidas ao déficit hídrico permaneceram sem reposição hídrica durante 12 dias, quando foi verificado nas plantas que não receberam H_2O_2 assimilação líquida de CO_2 abaixo de 0 μmol m^{-2} s^{-1}, mensurado por meio de IRGA. Ao final do décimo segundo dia após aplicação dos tratamentos foliares (DAA) retornou-se a rega com solução nutritiva 50% para todos os tratamentos. Todas as plantas foram mantidas com frequência de rega a cada dois dias até o vigésimo sexto DAA quando se encerrou o ensaio.

1.4.3 Fluorescência da clorofila *a* e curva de carboxilação da RuBisCO

Fluorescência da clorofila *a* foi medida com auxílio de equipamento analisador de gases por radiação infravermelha (IRGA), modelo GSF 3000, Walz, e fluorômetro portátil de luz modulada (LED-ARRAY/PAM-Module 3055-FL) acoplado ao GSF 3000. As folhas foram aclimatadas durante 30 minutos no escuro, em seguida, foi fornecida um pulso de luz actínica de 4500 μmol m^{-2} s^{-1} aplicado para a obtenção de Fm (fluorescência máxima adaptada ao escuro). Foram mensurados eficiência quântica potencial do FS II (Fv/Fm), fluorescência mínima adaptada ao escuro (Fo) e quenching não-fotoquímico (NPQ). As medições foram realizadas no intervalo das 9 às 11 horas da manhã, na segunda ou terceira folha totalmente expandida. As avaliações foram realizadas aos 12 (auge do déficit hídrico), 14 (48 horas após retorno da rega) e 19 DAA.

Para analisar os efeitos dos tratamentos sobre a difusão e limitações bioquímicas para assimilação de CO_2 realizou-se a curva de resposta fotossintética à concentração de CO_2 (curva A/Ci, onde Ci corresponde a concentração de CO_2 na câmara subestomática, expresso em μmol mol^{-1}), conforme orientações de Sharkey et al.[20]. As medições foram iniciadas sob concentração de CO_2 na câmara de trocas gasosas de 400 μmol mol^{-1}, e posterior redução para 300, 200, 100, 50 e 0 μmol mol^{-1}. Em seguida elevou-se novamente a 400 μmol mol^{-1} e a seguir 700, 1000, 1300, 1600 e encerrou-se com 2000 μmol mol^{-1} CO_2. As medidas foram obtidas sob irradiância de 1200 μmol m^{-2} s^{-1} com fluxo de ar de 750 μmol m^{-2} s^{-1}.

A partir dos dados obtidos, foram estimadas as variáveis velocidade máxima de carboxilação da RuBisCO (V_{cmax} - μmol m^{-2} s^{-1}), taxa de regeneração da RubP atrelada ao transporte de elétrons (J - μmol m^{-2} s^{-1}), taxa de regeneração da RubP atrelada a utilização de trioses fosfato (*TPU* - μmol m^{-2} s^{-1}), taxa de respiração diária (R_d - μmol m^{-2} s^{-1}) através do software “A/Ci curve fitting utility version 2007.1”[20]. Também estimou-se a taxa de fotorrespiração (μmol m^{-2} s^{-1}) a partir da cinética da RuBisCO, conforme Sharkey[36]. As avaliações foram realizadas aos 9 e 23 DAA.

1.4.4 Análise de crescimento

Foi realizada por mensuração de área foliar (AF) com utilização de equipamento LI-3100C Area Meter, e avaliação da biomassa seca de folhas (MSF), e biomassa seca total (MST) após secagem do material em estufa de circulação forçada de ar, a 40ºC, até obtenção de matéria seca constante. As coletas foram realizadas aos 0, 7, 14, 21 e 35 DAA.

Foram calculados os índices de crescimento razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), peso específico da folha (PEF), razão de massa foliar (RMF), taxa assimilatória líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR), segundo Benincasa[37]:

RAF ($dm^2\ g^{-1}$) = AF/MST

AFE ($dm^2\ g^{-1}$) = AF/MSF

PEF ($dm^2\ g^{-1}$) = 1/AFE

RMF = MSF/MST

TAL ($g\ dm^{-2}\ dia^{-1}$) = (P2 - P1 / t2 – t1) x (ln AF2 – ln AF1) / (AF2 – AF1)

TCR ($g\ g^{-1}\ dia^{-1}$) = (ln P2 – ln P1) / (t2 – t1); onde P1 e P2 são duas amostragens sucessivas e t é o tempo decorrido

1.4.5 Conteúdo relativo de água de folhas de tomateiro

Foram determinados o acúmulo de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose e amido das folhas de tomateiro, aos 12 e 24 DAA. A extração dos carboidratos foi realizada a partir de 100 mg de amostras de folhas frescas moídas e congeladas, segundo orientações de Garcia et al.[39]. Para açúcares solúveis totais, redutores e sacarose, utilizou-se solução de etanol 80% com posterior incubação em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugação em temperatura de 4°C a 12.000 g por 15 minutos. A extração do amido foi obtida com utilização de solução de ácido perclórico a 52% e agitação sob banho de gelo por 5 minutos, com posterior centrifugação em temperatura de 4°C a 10.000 g por 5 minutos. Todos os carboidratos foram expressos em mg g^{-1} de peso fresco.

A quantificação dos açúcares totais foi realizada de acordo com Morris, Yemm e Willis[40,41], utilizando reagente de antrona e curva padrão de glicose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Açúcares redutores foram quantificados conforme Miller[42] utilizando reagente DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico + hidróxido de cobre + tartarato de sódio e potássio) e curva padrão de glicose com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 540 nm. Sacarose foi quantificada conforme Passos [43] e utilizou reagente de antrona, hidróxido de potássio e curva padrão de sacarose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Amido foi quantificado segundo método de Morris, Yemm e Willis[40,41] e utilizou reagente de antrona e curva padrão de glicose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Todas as leituras foram realizadas em duplicatas.

1.4.6 Carboidratos

Foram determinados o acúmulo de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose e amido das folhas de tomateiro, aos 12 e 24 DAA. A extração dos carboidratos foi realizada a partir de 100 mg de amostras de folhas frescas moídas

e congeladas, segundo orientações de Garcia et al.[39]. Para açúcares solúveis totais, redutores e sacarose, utilizou-se solução de etanol 80% com posterior incubação em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugação em temperatura de 4°C a 12.000 g por 15 minutos. A extração do amido foi obtida com utilização de solução de ácido perclórico a 52% e agitação sob banho de gelo por 5 minutos, com posterior centrifugação em temperatura de 4°C a 10.000 g por 5 minutos. Todos os carboidratos foram expressos em mg g^{-1} de peso fresco.

A quantificação dos açúcares totais foi realizada de acordo com Morris, Yemm e Willis[40,41], utilizando reagente de antrona e curva padrão de glicose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Açúcares redutores foram quantificados conforme Miller[42] utilizando reagente DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico + hidróxido de cobre + tartarato de sódio e potássio) e curva padrão de glicose com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 540 nm. Sacarose foi quantificada conforme Passos [43] e utilizou reagente de antrona, hidróxido de potássio e curva padrão de sacarose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Amido foi quantificado segundo método de Morris, Yemm e Willis[40,41] e utilizou reagente de antrona e curva padrão de glicose, com leitura de absorbância em espectrofotômetro à 620 nm. Todas as leituras foram realizadas em duplicatas.

1.4.7 Pigmentos foliares

A extração de pigmentos foliares foi realizada conforme Sims e Gamon[44], com amostras de 50 mg de folhas frescas, moídas e congeladas e soluções Tris 0,2 M (pH 7,8), acetona 80%. As amostras foram homogeneizadas com a solução Tris-acetona e colocadas ao freezer por uma hora, com posterior agitação em vórtex. O macerado foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos em 4°C. Realizou-se leitura de absorbância do sobrenadante nos comprimentos de onda de 663 nm (clorofila *a*), 647 nm (clorofila *b*), 537 nm (antocianinas) e 470 nm (carotenoides). Os resultados foram expressos em mg de pigmento g^{-1} de matéria seca, utilizando os valores do conteúdo relativo de água verificados em cada tratamento para correção em relação a massa fresca das amostras. As avaliações foram realizadas aos 12 e 24 DAA. As equações utilizadas para cálculo dos pigmentos foram:

Clorofila *a* = 0,01373 x (A663) – 0,000897 x (A537) – 0,003046 x (A647)
Clorofila *b* = 0,02405 x (A647) – 0,004305 x (A537) – 0,005507 x (A663)
Antocianina = 0,08173 x (A537) – 0,00697 x (A647) – 0,002228 x (A663)
Carotenoide = (A470 – (17,1 x (Cl*a* + Cl*b*) – 9,479 x (antocianina))/119,26

1.4.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância, realizada em fatorial duplo, sendo testadas as diferenças entre os tratamentos e suas interações para cada época de avaliação. Os resultados foram comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Utilizou-se o software MetaboAnalyst 5.0 para geração de mapa de calor que estabeleceu cluster com relações entre os tratamentos e as variáveis analisadas, para os períodos sob déficit hídrico e de plantas recuperadas.

REFERÊNCIAS

Waqas, M. A. *et al.* Potential Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants Induced by Thiourea. *Front. Plant Sci.* **10**, (2019).

2. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Crops and livestock products* (2021). Available at: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL. (Accessed: 5th February 2023)

3. Zafar-Ul-hye, M. *et al.* Rhizobacteria inoculation and caffeic acid alleviated drought stress in lentil plants. *Sustain.* **13**, 1–14 (2021).

4. Zhu, T. *et al.* Ethylene and hydrogen peroxide are involved in brassinosteroid-induced salt tolerance in tomato. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).

5. Hatzig, S. *et al.* Early osmotic adjustment responses in drought-resistant and drought-sensitive oilseed rape Sarah. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 797–809 (2014).

6. Wilhelm, C. & Selmar, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **168**, 79–87 (2011).

7. Noguchi, K. & Yoshida, K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* **8**, 87–99 (2008).

8. Miyake, C. Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: Molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1951–1963 (2010).

9. Foyer, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* **154**, 134–142 (2018).

10. Gilroy, S. *et al.* A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* **19**, 623–30 (2014).

11. Cerný, M. *et al.* Molecular Sciences Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. (2018). doi:10.3390/ijms19092812

12. Choi, W.-G. *et al.* Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca 2+ , ROS and electrical signals. *Plant J.* **90**, 698–707 (2017).

13. Qureshi, M. K., Gawroński, P., Munir, S., Jindal, S. & Kerchev, P. Hydrogen peroxide-induced stress acclimation in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 1–16 (2022).

14. Ishibashi, Y. *et al.* Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J. Plant Physiol.* **168**, 1562–1567 (2011).

15. Jamaludin, R. *et al.* Influence of exogenous hydrogen peroxide on plant physiology, leaf anatomy and rubisco gene expression of the Ficus deltoidea Jack var. deltoidea. *Agronomy* **10**, (2020).

16. Khan, T. A., Yusuf, M. & Fariduddin, Q. Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. *Photosynthetica* **56**, 1237–1248 (2018).

17. Vassey, T. L., Quick, W. P., Sharkey, T. D. & Stitt, M. Water stress, carbon dioxide, and light effects on sucrosephosphate synthase activity in Phaseolus vulgaris. *Physiol. Plant.* **81**, 37–44 (1991).

18. Sharkey, T. D. Is triose phosphate utilization important for understanding photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **70**, 5521–5525 (2019).

19. Ozaki, K. *et al.* Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. *J. Plant Physiol.* **166**, 569–578 (2009).

20. Sharkey, T. D., Bernacchi, C. J., Farquhar, G. D. & Singsaas, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell Environ.* **30**, 1035–1040 (2007).

21. Charles, S. A. & Halliwell, B. Light Activation of Fructose Bisphosphatase in Isolated Spinach Chloroplasts and Deactivation by Hydrogen Peroxide: A Physiological Role for the Thioredoxin System. *Planta* **151**, 242–246 (1981).

22. Rashid, N. *et al.* Exogenous Application of Biostimulants and Synthetic Growth Promoters Improved the Productivity and Grain Quality of Quinoa Linked with Enhanced Photosynthetic Pigments and Metabolomics. *Agronomy* **11**, 1–16 (2021).

23. Martinazzo, E. G. *et al.* Análise de crescimento e partição de assimilados em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom submetidas ao nitrogênio e piraclostrobina. *Semin. Ciências Agrárias* **36**, 3001 (2015).

24. Cao, B., Ma, Q., Zhao, Q., Wang, L. & Xu, K. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* **194**, 53–62 (2015).

25. Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., CZYGAN Lehrstuhlfiur Botanik BD, F. I. & Pharmazeutische Biologie, L. A. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.* **84**, 218–224 (1987).

26. Murchie, E. H. & Lawson, T. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* **64**, 3983–3998 (2013).

27. Lima Neto, M. C., Cerqueira, J. V. A., Cunha, J. R. da, Ribeiro, R. V. & Silveira, J. A. G. Cyclic electron flow, NPQ and photorespiration are crucial for the establishment of young plants of Ricinus communis and Jatropha curcas exposed to drought. *Plant Biol.* **19**, 650–659 (2017).

28. Atkin, O. K., Millar, A. H., Gardeström, P. & Day, D. A. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism and Respiration in Leaves of Higher Plants. 153–

175 (2000). doi:10.1007/0-306-48137-5_7

29. Živanović, B. *et al.* Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. *Plants* **9**, 1–17 (2020).

30. Jeandet, P., Formela-Luboińska, M., Labudda, M. & Morkunas, I. The Role of Sugars in Plant Responses to Stress and Their Regulatory Function during Development. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).

31. Xu, Q., Chen, S., Yunjuan, R., Chen, S. & Liesche, J. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. *Plant Physiol.* **176**, 930–945 (2018).

32. Habib, N. *et al.* Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (Triticum aestivum L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. **9**, 285 (2020).

33. Nurnaeimah, N. *et al.* The Effects of Hydrogen Peroxide on Plant Growth, Mineral Accumulation, as Well as Biological and Chemical Properties of Ficus deltoidea. *Agronomy* **10**, 1–19 (2020).

34. Cirillo, V. *et al.* Anthocyanins Are Key Regulators of Drought Stress Tolerance in Tobacco. *Biology (Basel).* **10**, 1–15 (2021).

35. Hoagland, R. & Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* **347**, (1950).

36. Sharkey, T. D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol. Plant.* **73**, 147–152 (1988).

37. Benincasa, M. M. P. *Análise de crescimento de plantas (noções básicas)*. (Funep, 2003).

38. Elsheery, N. I. & Cao, K.-F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiol Plant* **30**, 769–777 (2008).

39. Garcia, I. S., Souza, A., Barbedo, C. J., Dietrich, S. M. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. Changes in soluble carbohydrates during storage of Caesalpinia echinata LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian J. Biol.* **66**, 739–745 (2006).

40. Morris, D. L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science (80-.).* **107**, 254–255 (1948).

41. Yemm, E. W. & Willis, A. J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochem. J* **57**, 508–514 (1954).

42. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).

43. Passos, L. P. *Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal*. (EMBRAPA - CNPGL, 1996).

44. Sims, D. A. & Gamon, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* **81**, 337–354 (2002).

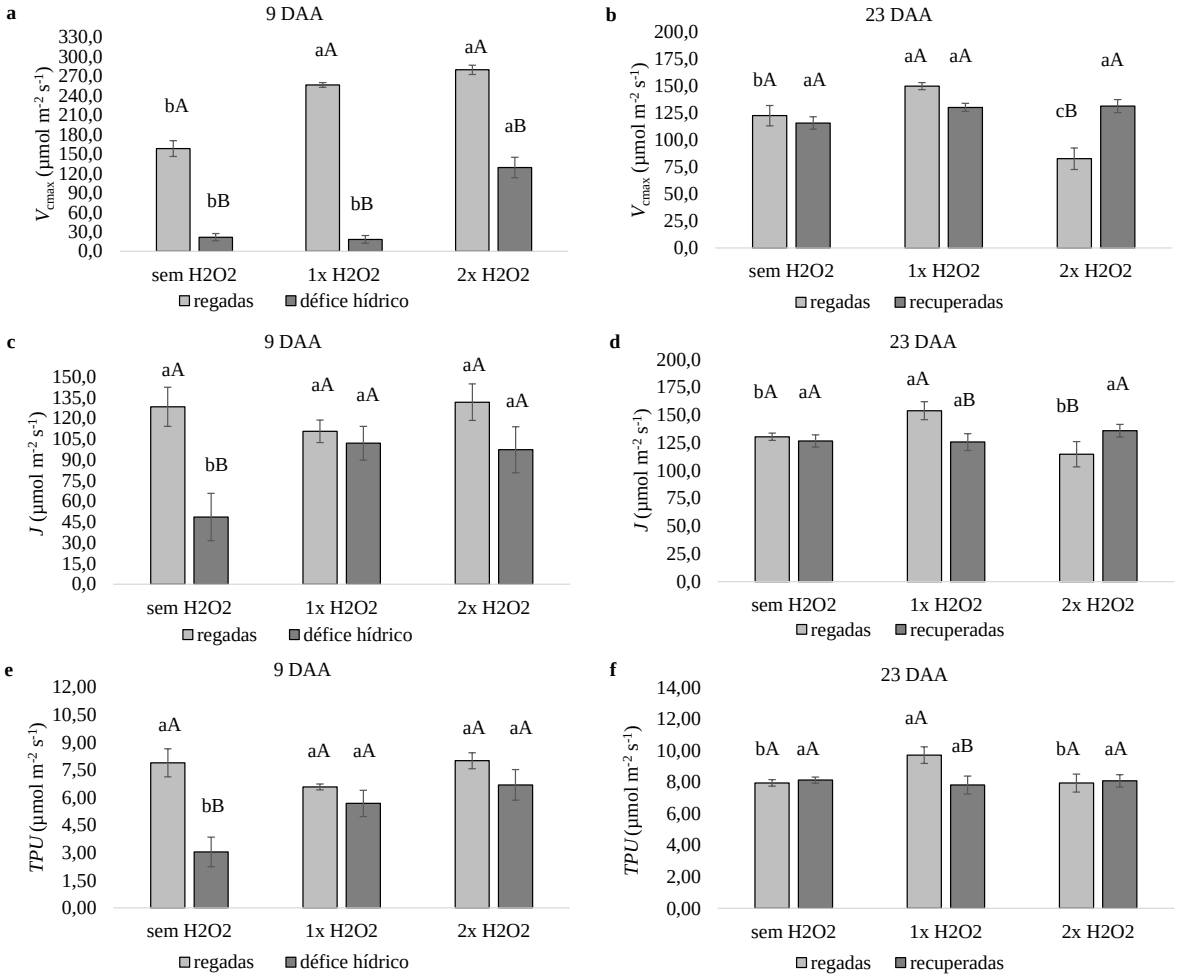

Figura 1. Velocidade máxima de carboxilação da RuBisCO (V_{cmax}), taxa de regeneração da RubP atrelada ao transporte de elétrons (J), taxa de regeneração da RubP atrelada a utilização de trioses fosfato (TPU) de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (9 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (23 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

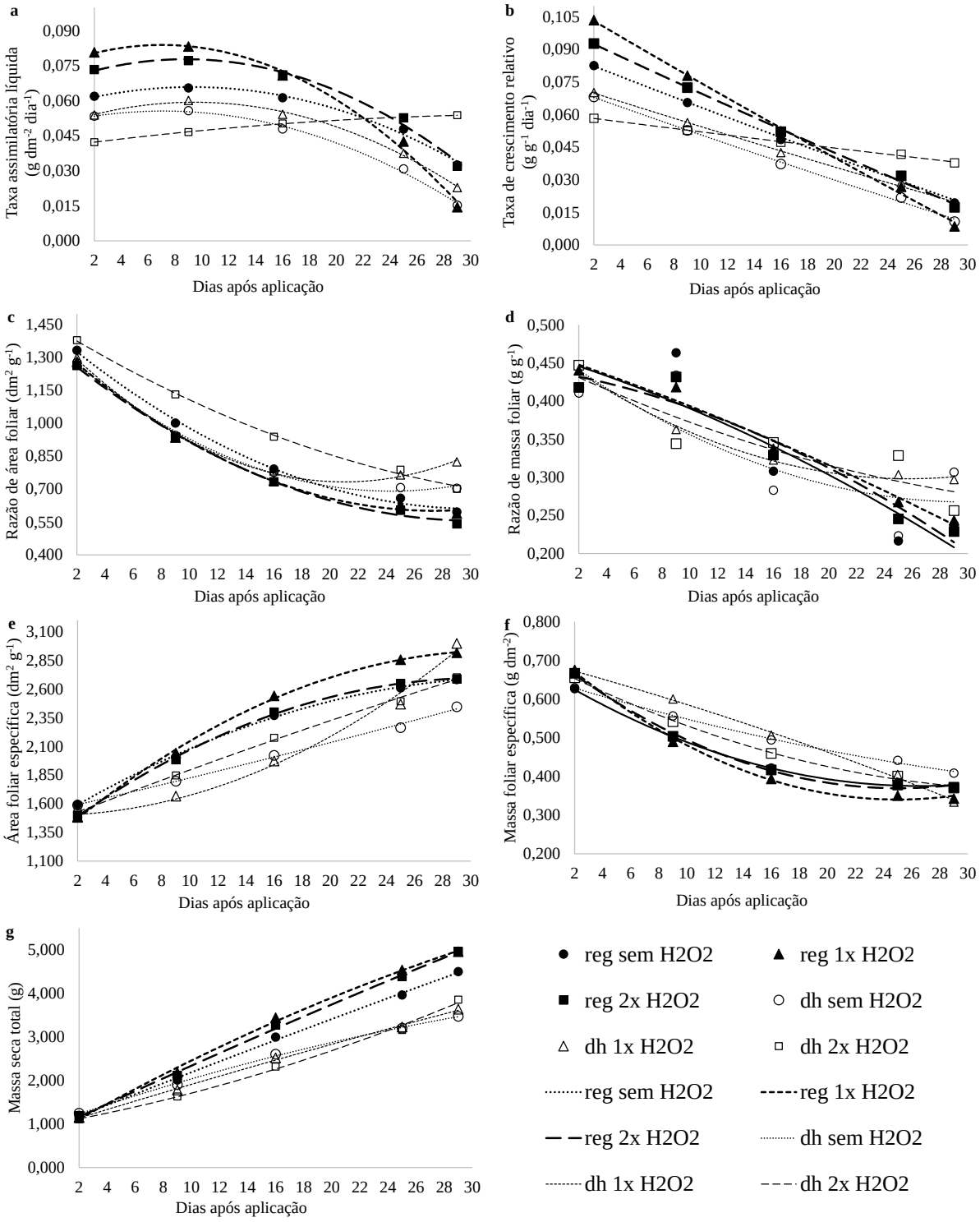

Figura 2. Índices de crescimento de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico/recuperadas, e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. O retorno da rega ocorreu ao final do décimo segundo dia.

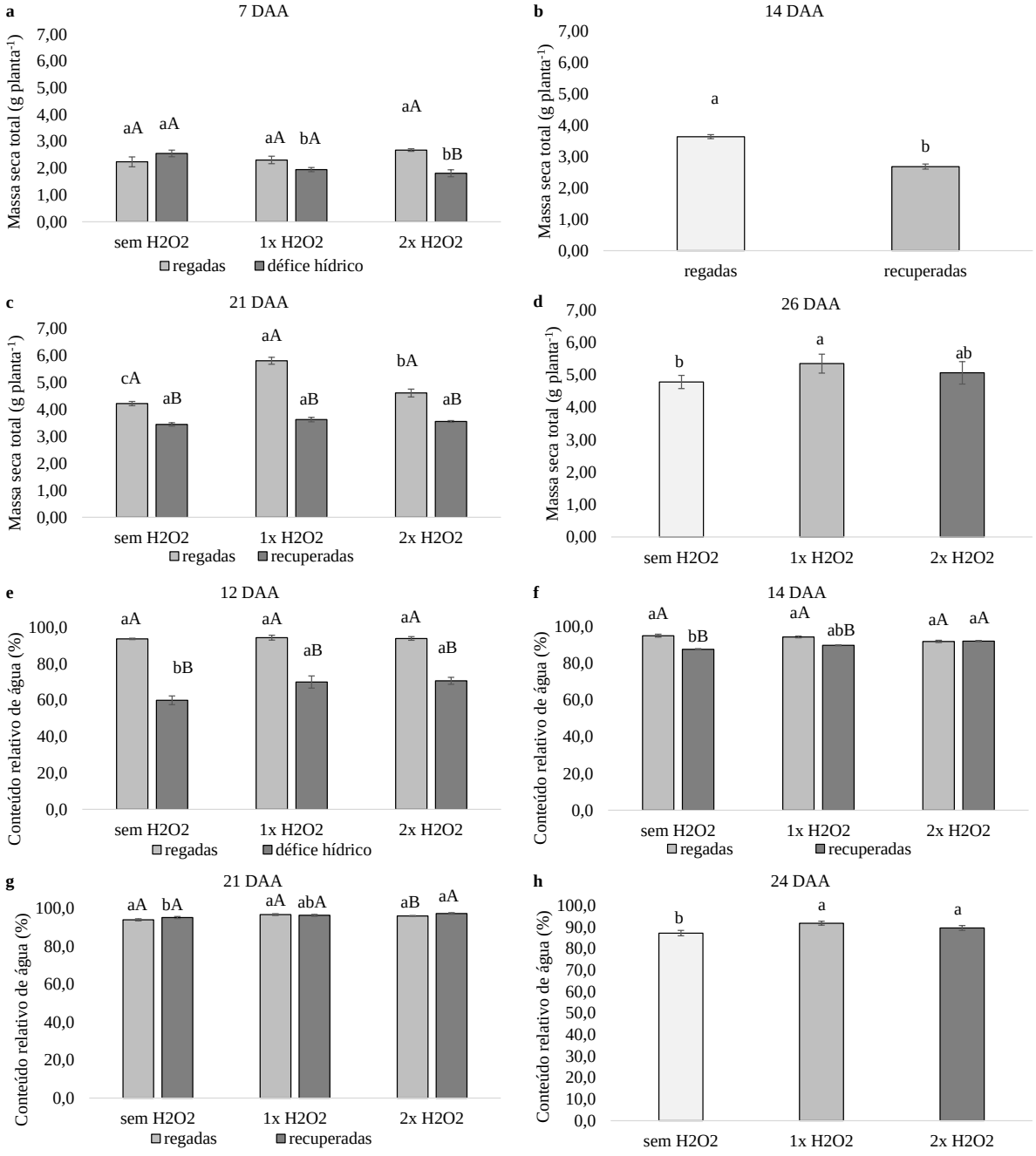

Figura 3. Massa seca total e conteúdo relativo de água de folhas de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (7 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (14, 21, 24 e 26 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Os valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

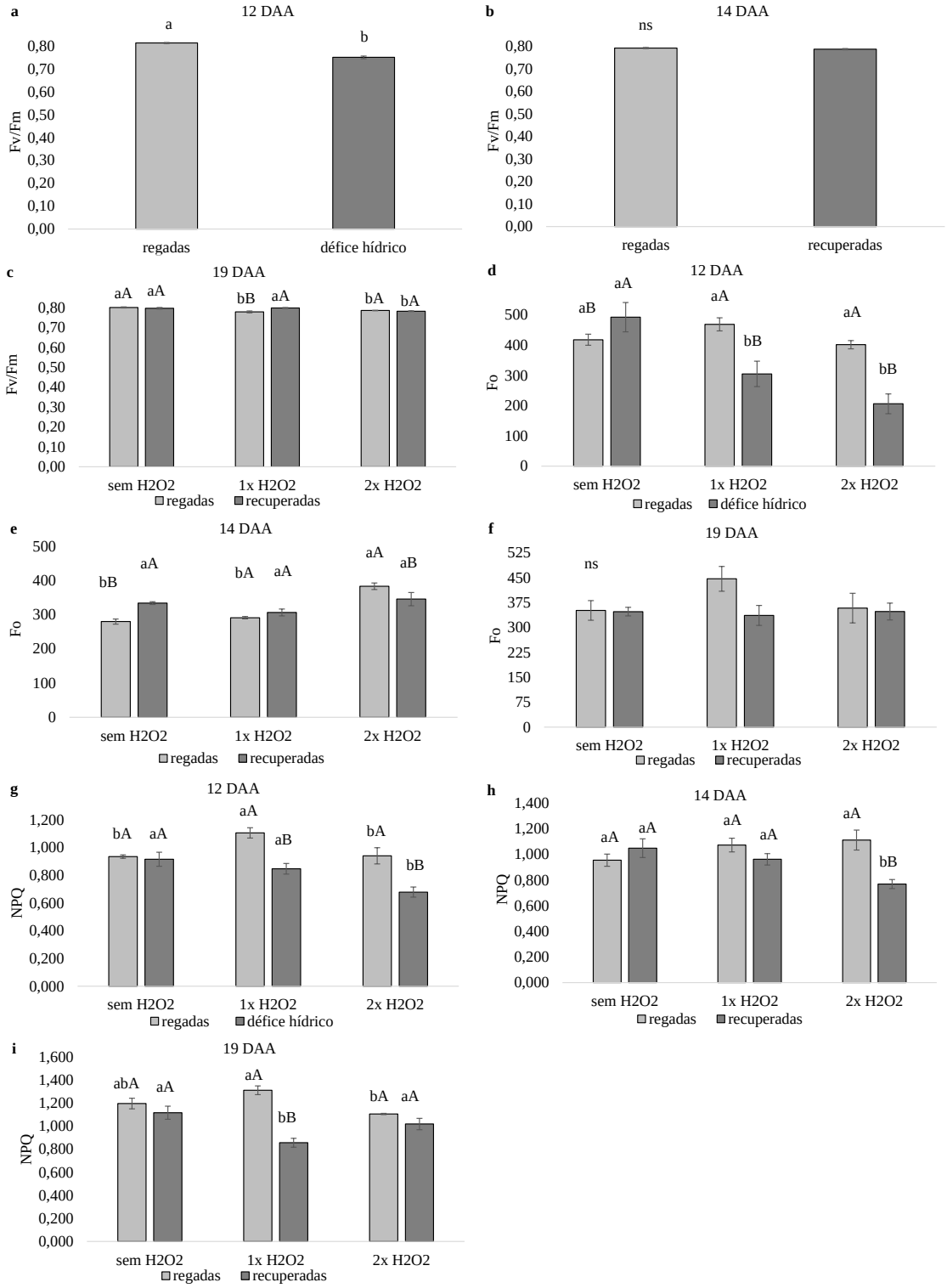

Figura 4. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), fluorescência mínima adaptada ao escuro (Fo) e quenching não fotoquímico (NPQ) de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (12 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (14 e 19 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

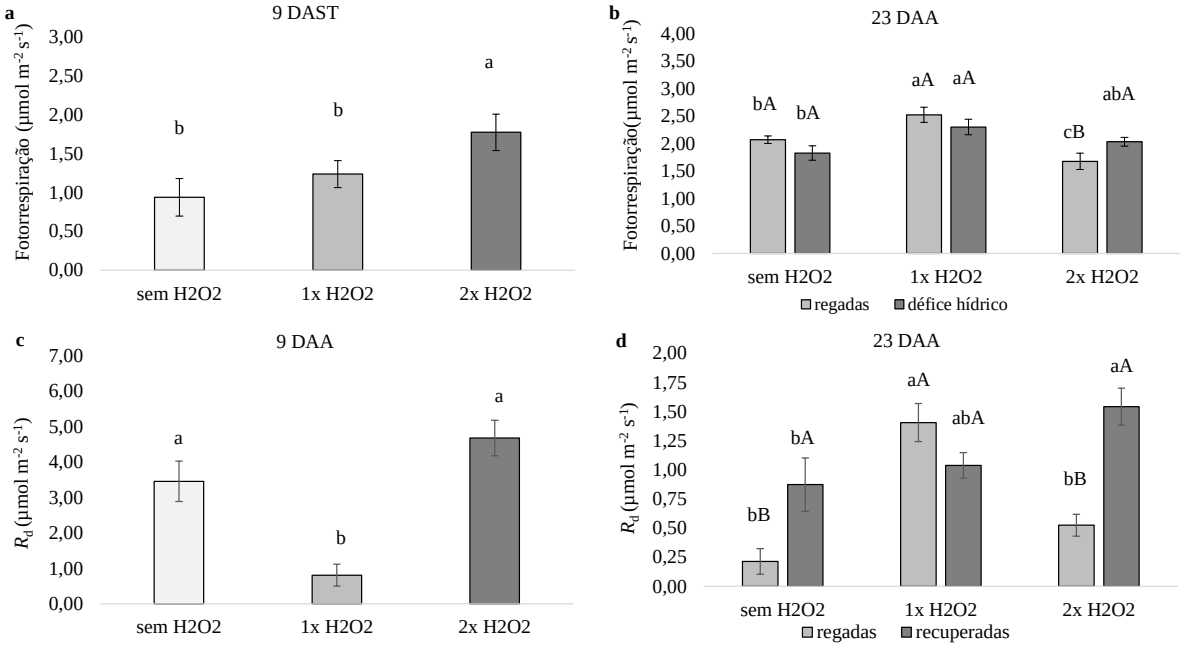

Figura 5. Taxa de fotorrespiração e respiração diária (R_d) de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (9 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (23 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

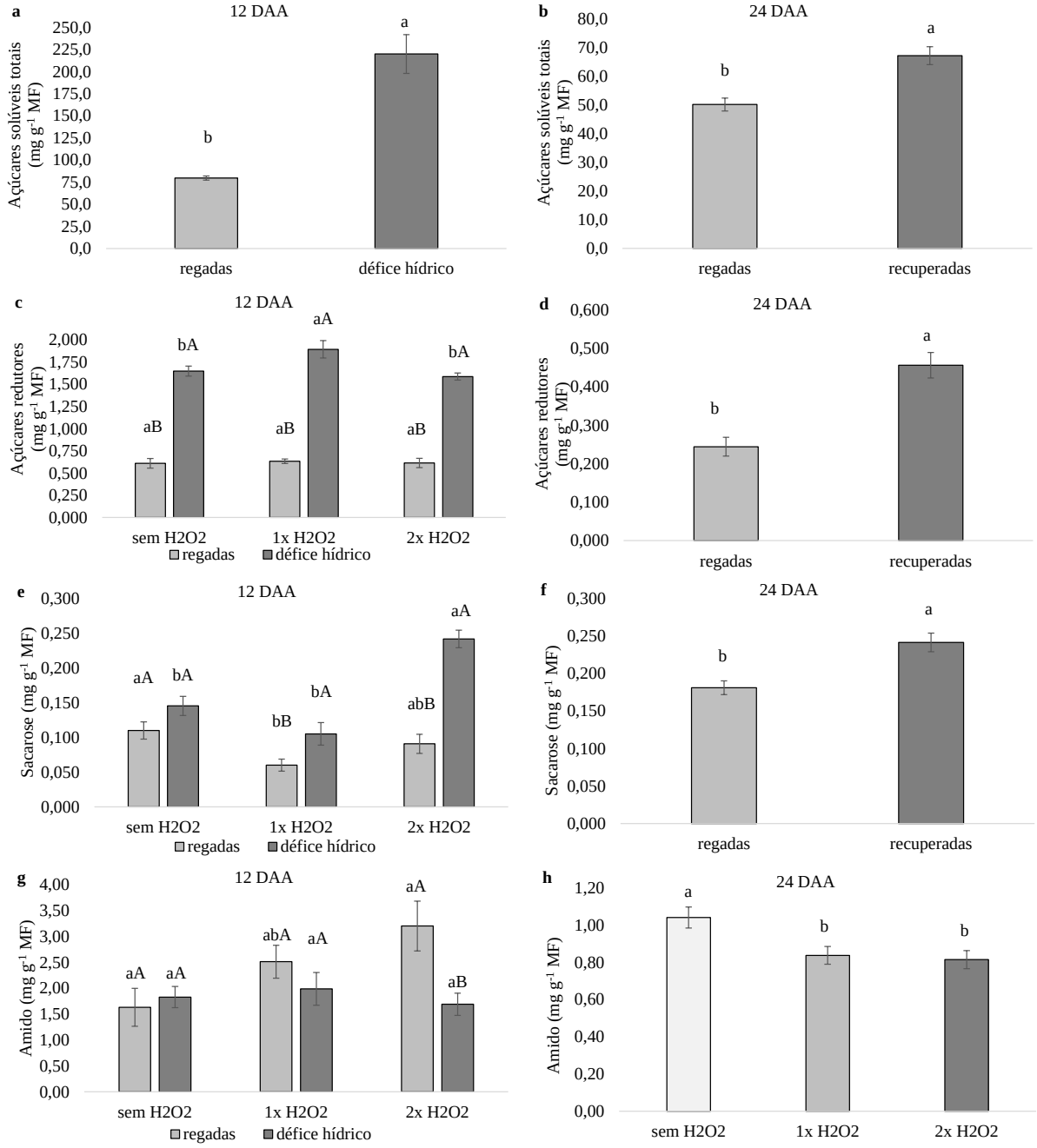

Figura 6. Carboidratos de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (12 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (24 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

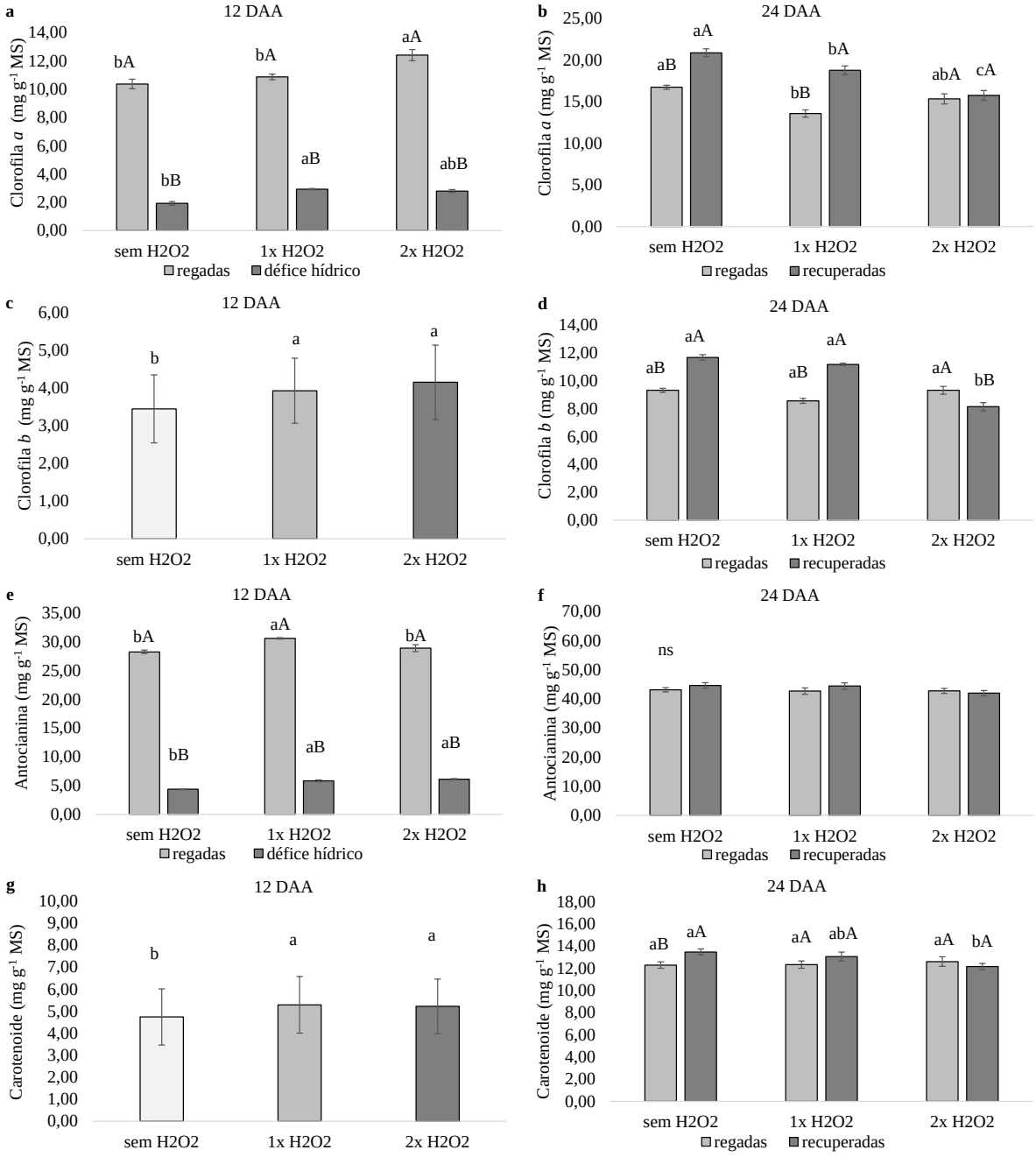

Figura 7. Pigmentos de plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico (12 dias após o início dos tratamentos – DAA)/recuperadas (24 DAA), e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. Valores correspondem a média ± Erro Padrão (n=4). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (<0,05), maiúsculas entre condição hídrica e minúsculas entre aplicação foliar de H_2O_2.

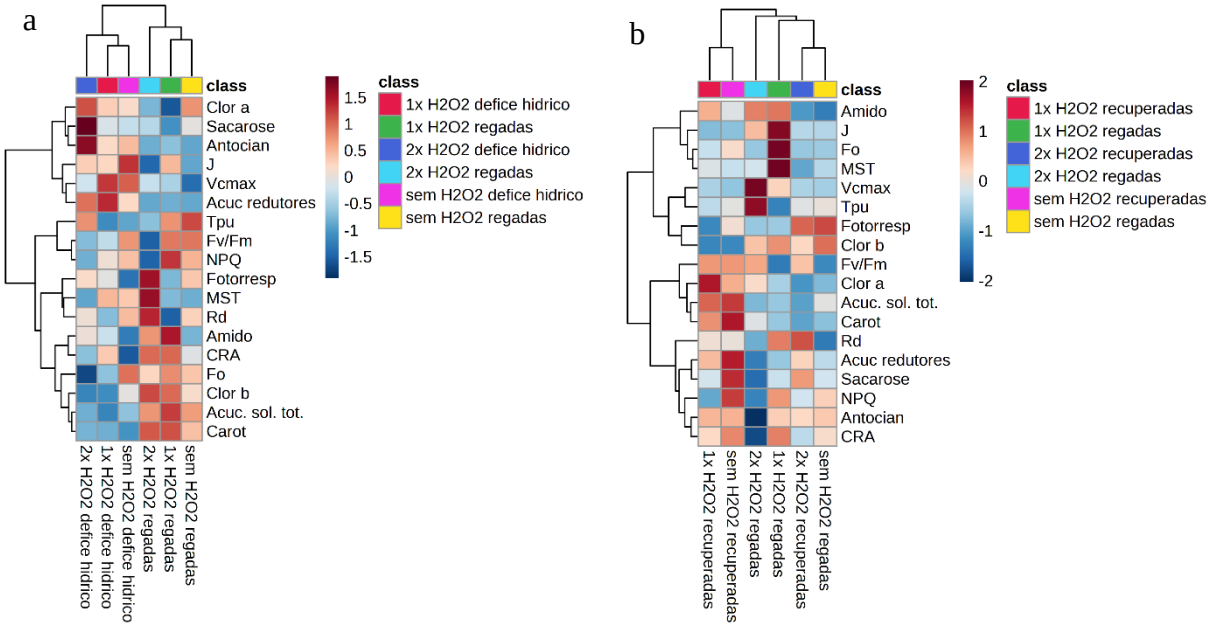

Figura 8. Mapa de calor e análise hierárquica de cluster para avaliações de fluorescência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), fluorescência mínima adaptada ao escuro (Fo), quenching não fotoquímico (NPQ), velocidade máxima de carboxilação da RuBisCo (V_{cmax}), taxa de regeneração da RubP atrelada ao transporte de elétrons (*J*), taxa de regeneração da RubP atrelada a utilização de trioses fosfato (*TPU*), fotorrespiração (Fotorresp), respiração diária (R_d), massa seca total (MST), conteúdo relativo de água de folhas (CRA), clorofila *a* (Clor a), clorofila *b* (Clor b), antocianina (Antocian), carotenoides (Carot), açúcares solúveis totais (Acuc. sol. tot.), açúcares redutores (Acuc. redutores), sacarose (Sacarose) e amido (Amido) em plantas de tomate regadas ou submetidas ao déficit hídrico/recuperadas, e zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2. (a) avaliações durante o déficit hídrico e (b) avaliações após recuperação pelo retorno da rega. O mapa de calor foi gerado pelo software MetaboAnalyst v5.0 (https://www.metaboanalyst.ca/)

CAPÍTULO 2

APLICAÇÃO FOLIAR DE H_2O_2 PROMOVE AJUSTE FOTOQUÍMICO E OSMÓTICO NA ACLIMATAÇÃO DE TOMATEIRO DURANTE A SECA E APÓS RECUPERAÇÃO

Resumo

O impacto da restrição hídrica na produção agrícola pode ser devastador e o cenário atual das mudanças climáticas traz novos desafios aos cultivos que dependem de oferta regular de chuvas. A sinalização por espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um mecanismo conhecido de percepção de estresse pelas plantas e pode ser explorada como estratégia para reduzir o impacto do estresse por meio da aclimatação sistêmica adquirida. Investigamos neste estudo como a aplicação foliar de H_2O_2 atua no desempenho fotossintético, sistema antioxidante, perfil químico de açúcares e ajuste osmótico de tomateiro submetido à seca e após recuperação. O experimento foi realizado em blocos casualizados em fatorial 3x2, com uma, duas ou sem aplicação foliar de H_2O_2, em plantas constantemente regadas ou submetidas à seca. As plantas foram avaliadas no período de seca, e após recuperação pelo retorno da rega. Foram avaliados potencial água da folha, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, peroxidação lipídica, concentrações foliares de H_2O_2, fenóis, prolina, atividade de enzimas antioxidantes e perfil químico de açúcares solúveis. Nossos resultados indicaram que aplicação foliar de H_2O_2 provocou alterações metabólicas no tomateiro independente da condição hídrica, e que duas aplicações em plantas submetidas à seca resultaram em menor estresse oxidativo durante a seca e recuperação mais rápida após retorno da rega. Plantas constantemente regadas também se beneficiaram da aplicação foliar de H_2O_2 com maior atividade fotossintética.

2.1 INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é o principal fator abiótico de estresse observado na agricultura (WAQAS et al., 2019) e o investimento econômico em uma safra pode ser perdido ou reduzido com a ocorrência de um único evento. O atual contexto das

mudanças climáticas evidencia ainda mais esse problema, visto que eventos climáticos extremos, como períodos de seca mais prolongada e fora de sua previsibilidade normal devem ocorrer com maior frequência (IPCC, 2022). Dessa forma, estratégias para reduzir o impacto do déficit hídrico são essenciais para a sustentabilidade da prática agrícola.

Uma possível prática a ser empregada se baseia na aclimatação sistêmica adquirida que ocorre como resultado da comunicação por longa distância através dos diversos órgãos e tecidos da planta (CHOI et al., 2017). Basicamente um estímulo estressante, como alta incidência luminosa, temperatura ou estresse osmótico acarreta sinalização que é distribuída por toda planta, que reage com a expressão de genes que levam a maior atividade de enzimas e moléculas com ação antioxidante. Essa resposta é aprendida pela planta, e caso um evento subsequente leve ao mesmo tipo de sinalização, o sistema de defesa poderá ser mais efetivo em sua ação, permitindo melhor performance da planta mesmo em condições adversas (CHOI et al., 2017; CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018).

Sinalização por ERO é um mecanismo conhecido de percepção de estresse pelas plantas, porém as modificações que ocorrerão no metabolismo após essa sinalização ainda não está elucidado para as diversas espécies de plantas (SINGH et al., 2016). H_2O_2, por exemplo está envolvido no processo de fechamento estomático, intimamente ligado ao status hídrico da planta e do solo. No entanto, a movimentação estomática é apenas a primeira resposta visual ao déficit hídrico.

Ishibashi et al., (2011) verificaram que a aplicação de H_2O_2 em plantas de soja, anteriormente ao estresse hídrico, aumentou a tolerância da planta a evento de estresse subsequente, por aumento da concentração de açúcares solúveis nas células, resultando em melhor condição hídrica. Outros pesquisadores observaram aumento do desempenho de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e ascorbato peroxidase (APX), decorrentes do fornecimento exógeno de H_2O_2 em plantas de trigo e milho submetidas, respectivamente, ao estresse hídrico e salino, que resultaram em menor peroxidação lipídica de componentes celulares (DE AZEVEDO NETO et al., 2005; HABIB et al., 2020). Em tomateiros tolerantes a seca, a produção de moléculas que atuam na desintoxicação por ERO é maior, com destaque para fenóis e polifenóis (SÁNCHEZ-

RODRÍGUEZ et al., 2011) e também para enzimas como SOD, CAT e APX (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012). Tomateiro mutante deficiente na produção de ácido abscísico (ABA) e submetido à seca revelou maior acúmulo de arabinose, glicose, frutose e sacarose como estratégia para compensar a alta condutância estomática e evitar a desidratação (ŽIVANOVIĆ et al., 2020).

O tomateiro é uma das culturas agrícolas mais importantes e com ampla distribuição mundial de cultivo (FAOSTAT, 2021) e embora muitas vezes seja produzido em ambiente protegido e com alta tecnologia, a maior parte do cultivo ocorre à campo onde está sujeito as condições e variações ambientais. Desse forma, levantamos a hipótese de que a aplicação foliar de H_2O_2 em tomateiro antecedendo a restrição hídrica sinaliza alterações no metabolismo da planta, resultando em recuperação por menor prejuízo decorrente de danos oxidativos.

Investigamos neste estudo como a aplicação foliar de H_2O_2 atua no desempenho fotossintético, sistema antioxidante, perfil químico de açúcares e ajuste osmótico de tomateiro submetido à seca e após recuperação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Ambiente de cultivo, delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi realizado entre outubro/2020 e dezembro/2020 na área experimental do Departamento de Biodiversidade e Bioestatística da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil, coordenadas geográficas 22° 53′ 09″W 48° 26′ 42″ S e 800 m altitude média. O cultivo ocorreu em casa de vegetação Van der Hoeven com controle de temperatura e umidade. Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) obtidas por semeadura em bandeja e substrato vermiculita, foram utilizadas como modelo. As plantas foram cultivadas em vasos individuais de 1 dm^3, contendo 130 g de vermiculita como substrato e fertilizadas a cada dois dias com solução nutritiva nº 2 (HOAGLAND; ARNON, 1950), inicialmente a 25% da força iônica, e após sete dias a 50%. Por ocasião do florescimento, iniciou-se os tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados em fatorial 3x2 e quatro repetições. As plantas receberam pulverização foliar de água (sem H_2O_2), uma pulverização de 1 mM de H_2O_2 (1 aplicação de H_2O_2) ou duas pulverizações foliares de 1 mM de H_2O_2, com 24h de intervalo (2 aplicações de H_2O_2). A aplicação foliar foi realizada com pulverizador costal de CO_2, com ponta do tipo leque, sendo aplicado aproximadamente 8 mL da solução (água deionizada + adjuvante não iônico) por planta. Após a segunda aplicação foliar, metade das plantas receberam água a cada dois dias (plantas regadas) e outra metade permaneceu sem reposição hídrica durante doze dias (plantas submetidas à seca), quando foram avaliadas. Após essa avaliação, todas as plantas passaram a receber solução nutritiva (nº 2, 50%) durante mais doze dias quando se realizou nova avaliação, denominando-se a partir de então plantas constantemente regadas e plantas recuperadas da seca.

2.2.2 Mensuração de potencial água da folha

O potencial água nas folhas (PAF) foi obtido com auxílio do potenciômetro de ponto de orvalho WP4-T (Decagon Devices). Amostras de folhas de cada repetição foram finamente cortadas (aproximadamente 20 x 5 mm) e utilizadas para a determinação, seguindo as recomendações do fabricante, com as leituras do potencial água expressas em -MPa.

2.2.3 Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas

As medições foram realizadas com equipamento analisador de gases por radiação infravermelha (IRGA), modelo GSF 3000, Walz, sob irradiância saturante de 1200 μmol m^{-2} s^{-1}. As variáveis de fluorescência foram mensuradas por fluorômetro portátil de luz modulada (LED-ARRAY/PAM-Module 3055-FL) acoplado ao GSF 3000, com obtenção do rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{PSII}), dissipação de calor no complexo antena (D = 1 – Fv'/Fm') e energia não dissipada e não utilizada na fase fotoquímica (Ex = Fv'/Fm' (1-qP)) (DEMMIG et al., 1987; MURCHIE; LAWSON, 2013).

A partir da climatação das folhas ao escuro durante 30 minutos foi obtido coeficiente do quenching não fotoquímico da fluorescência (qN). As variáveis de trocas gasosas obtidas foram transpiração (*E* - mmol m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (*Gs* - mmol m^{-2} s^{-1}) e assimilação líquida de carbono (*A* - µmol m^{-2} s^{-1}) e calculada eficiência instantânea do uso da água (EUA_i - µmol CO_2 mmol $H2O^{-1}$) obtida pela relação entre *A* e *E*. As medições foram realizadas no intervalo das 9 às 11 horas da manhã, na segunda ou terceira folha totalmente expandida.

2.2.4 Quantificação da peroxidação lipídica e concentração de peróxido de hidrogênio foliares

Peroxidação lipídica foi quantificada segundo Heath; Packer, (1968), com 100 mg de amostra fresca congelada e moída e reagente ácido tiobarbitúrico + ácido tricloroacético, com banho-maria à 90°C por uma hora. O conteúdo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi submetido a leitura de absorbância em espectrofotômetro à 560 e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído g^{-1} de matéria seca.

Determinação do conteúdo foliar de peróxido de hidrogênio foi realizado conforme Alexieva et al., (2001) e utilizou 100 mg de amostra de folhas frescas moídas e congeladas, reagente ácido tricloroacético 0,1% e centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e misturado a tampão fosfato 0,1 M (pH 7) e iodeto de potássio 1M, com reação no escuro por 1 hora e posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro à 390 nm. Os resultados foram expressos em µmol H_2O_2 g^{-1} de matéria seca.utilizando a porcentagem de água contida em cada amostra e e obtidas pelo conteúdo relativo de água.

2.2.5 Atividade de enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC: 1.11.1.6), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) e ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.1)

A extração enzimática foi realizada pelo método de Kar; Mishra, (1976) com 100 mg de amostra de folhas frescas, moídas e congeladas, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8) e PVPP. A determinação de proteínas solúveis seguiu Bradford, (1976), com homogeneização do extrato enzimático com reativo de Bradford e leitura de absorbância em espectrofotômetro à 595 nm. e curva padrão de caseína. Atividade de SOD foi conforme Beauchamp; Fridovich, (1971). O sistema de reação foi composto por extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM. A reação ocorreu sob exposição à luz durante 5 minutos em temperatura ambiente, com posterior leitura de absorbância à 560 nm. A atividade foi expressa em unidade enzimática (U) na qual 1U é a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição na redução do NBT.

Atividade de CAT foi realizada conforme Peixoto et al., (1999), com o sistema de reação composto por extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mM pH (7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. Leituras de absorbância à 240 nm foram realizadas a cada 20 segundos e os cálculos foram realizados com o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio de 39,4 mmol L^{-1} cm^{-1}. A atividade da enzima foi expressa em nmol de H_2O_2 consumido min^{-1} mg $proteína^{-1}$. Atividade de POD foi realizada segundo Teisseire; Guy, (2000), com sistema de reação composto de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5), pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 5 mM. A reação foi em temperatura ambiente por 5 minutos, com posterior leitura de absorbância à 430 nm. Utilizou-se coeficiente de extinção molar da purpurogalina de 2,5 mmol L^{-1} cm^{-1} para cálculos. A atividade da enzima foi expressa em µmol de purpurogalina min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

Atividade de APX foi conforme Nakano; Asada, (1981), com o sistema de reação composto por extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, ascorbato 0,5 mM, peróxido de hidrogêno 10 mM e EDTA 0,1 mM. Leituras de absorbância à 300 nm foram realizadas a cada 20 segundos e os cálculos foram realizados com o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio de 39,4 mmol L^{-1} cm^{-1}. A atividade da enzima foi expressa em nmol de H_2O_2 consumido min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

2.2.6 Quantificação da concentração foliar de fenóis totais e prolina

Fenóis totais foram extraídos e quantificados conforme Bonoli et al., (2004). A extração foi realizada a partir de 100 mg de folhas frescas, congeladas e moídas e solução de acetona 50% (v/v), seguido de banho de ultrassom por 20 minutos. O sistema de reação foi composto por 1 mL do extrato, reagente folin (1:10) e solução de Na_2CO_3 a 20%. A reação ocorreu no escuro por uma hora, com posterior leituras de absorbância A 725 nm. Utilizou-se curva padrão de ácido gálico, e os resultados foram expressos em µg de fenóis totais g de matéria fresca^{-1}.

Prolina foi determinada conforme Bates et al., (1973), utilizando 250 mg de amostra de folhas frescas, moídas e congeladas, homogeneizadas com ácido sulfosalicílico 3% e posterior centrifugação à 4.000 x g por 5 minutos. O sistema de reação utilizou o extrato sobrenadante, ácido acético glacial e ninhidrina ácida em banho-maria em ebulição por uma hora. A extração da mistura foi realizada com tolueno com posterior leitura de absorbância à 520 nm. Utilizou-se curva padrão de prolina, e os resultados foram expressos em µmol prolina g de matéria fresca^{-1}.

2.2.7 Determinação do perfil químico de açúcares solúveis

O perfil dos açúcares foi determinado por cromatografia iônica de alta eficiência (Dionex ICS-5000+). Os extratos obtidos (por meio de 100 mg de amostras de folhas frescas, congeladas e moídas e extração tripla por etanol 80%) e os padrões foram filtrados (0,22 µm) e analisados por cromatografia, equipado com bomba quaternária, amostrador automático, detector eletroquímico DCS-5000 (Thermo®), coluna P-100 (Carbopack®), e eletrodos de trabalho de ouro e de referência Ag/AgCl. As fases eluentes A, B e C foram, respectivamente, hidróxido de sódio 640 mM, acetato de sódio 0,5M e água ultrapura, com vazão de 0,7 mL min^{-1} por 35 minutos. A identificação dos açúcares solúveis foi por comparação do tempo de retenção do pico da amostra com o tempo de retenção das misturas de padrões e com a co-injeção da solução dos padrões com a amostra (SUKSOM et al., 2015, modificado).

2.2.8 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto a homogeneidade da variância e normalidade, sendo posteriormente testadas as diferenças entre os tratamentos e suas interações para cada período de avaliação. Os resultados foram comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O mapa de calor foi obtido por meio do software MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca/).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Potencial água das folhas

As plantas do tratamento de seca permaneceram sob restrição hídrica até o décimo segundo dia a partir da aplicação dos tratamentos foliares, quando as folhas apresentaram potencial água -1,8 Mpa, valor aproximadamente 90% mais negativo em relação aos tratamentos regados (Figura 1a). Aplicação foliar de H_2O_2 não alterou o potencial água das folhas independentemente da condição hídrica das plantas. Doze dias após o retorno da rega, não houve variação no potencial água das folhas submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 1b).

2.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Plantas submetidas à seca apresentaram redução em Φ_{PSII} em relação as plantas regadas durante a restrição hídrica (Figura 2a). 1 aplicação de H_2O_2 resultou em maior Φ_{PSII} e menor qN, independente da condição hídrica das plantas (Figura 2b,c). Menores *D* e *Ex* foram observados, respectivamente, em plantas regadas e plantas sob seca que receberam 1 aplicação de H_2O_2 (Figura 2d,e). Após retorno da rega, as plantas mostraram completa recuperação do aparato fotossintético, pois não

houve diferença em Φ_{PSII} em relação as plantas constantemente regadas (Figura 2f). No entanto efeito de 1 aplicação de H_2O_2 pode ser observado nas plantas recuperadas que apresentaram menor qN em relação as que não receberam aplicação de H_2O_2 (Figura 2g).

2.3.3 Trocas gasosas

Plantas regadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior *A* na primeira avaliação, e aquelas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 apresentaram menores *E* e *Gs* no mesmo período (Figura 3a,b,c). Após retorno da rega, plantas recuperadas apresentaram menor *A* em relação as plantas regadas (Figura 3g), no entanto, entre plantas que não receberam aplicação de H_2O_2, maior EUA_i foi observado nas plantas recuperadas (Figura 3h). Entre as plantas constantemente regadas, as que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram maior EUA_i, igualando-se as plantas recuperadas.

2.3.4 Peroxidação lipídica e concentração foliar de H_2O_2

Foram observadas maiores concentrações foliares de MDA e H_2O_2 em plantas submetidas à seca em relação as plantas regadas (Figura 4a,b). No entanto, plantas submetidas à seca que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram menores concentrações de MDA e H_2O_2 em relação as que não receberam (Figura 4a,c). Após retorno da rega, não se observou diferença no MDA entre os tratamentos (Figura 4d). Plantas constantemente regadas apresentaram maior concentração foliar de H_2O_2 em relação as recuperadas e as plantas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior concentração foliar de H_2O_2 em relação as que não receberam aplicação de H_2O_2 (Figura 4e,f).

2.3.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Durante o período de restrição hídrica, plantas submetidas à seca apresentaram maior atividade de SOD, CAT e POD em relação às plantas regadas (Figura 5a,b,c). No mesmo período, apenas plantas submetidas à seca que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior atividade de APX (Figura 5d). Após o retorno da rega, verificou-se maior atividade de CAT em plantas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 (Figura 5f). Foi observado também que plantas constantemente regadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior atividade de APX em relação as que não receberam aplicação de H_2O_2, ao contrário das plantas recuperadas que receberam 2 aplicações de H_2O_2, que revelaram menor atividade dessa enzima (Figura 5h). Entre plantas recuperadas, apenas aquelas que não receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram maior atividade de APX em relação as plantas constantemente regadas.

2.3.6 Compostos fenólicos e prolina

Durante a restrição hídrica, plantas submetidas à seca apresentaram maiores concentrações foliares de fenóis totais e prolina que plantas regadas (Figura 6a,b). Nesse período, foi observado maior concentração de fenóis e menor concentração de prolina nas plantas submetidas à seca que receberam 2 aplicações de H_2O_2. Após retorno da rega, apenas plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram menor concentração de fenóis totais, enquanto a concentração de prolina das plantas recuperadas continuou maior em relação às plantas constantemente regadas (Figura 6c,d).

2.3.7 Perfil químico de açúcares solúveis

Na restrição hídrica, plantas submetidas à seca apresentaram maiores concentração dos açúcares solúveis arabinose, glicose, frutose e sacarose em relação

as plantas regadas (Figura 7b,d,e,f). Trealose não apresentou diferença e manose foi maior em plantas regadas (Figura 7a,c). Entre plantas regadas, foi maior a concentração de manose em plantas que não receberam aplicação de H_2O_2. Maiores concentrações de glicose e frutose foram observadas em plantas que receberam, respectivamente, 2 e 1 aplicações de H_2O_2. Em plantas submetidas à seca, aplicação de H_2O_2 proporcionou maior concentração de manose. Nessas plantas, maiores concentrações de arabinose, glicose e frutose ocorreram nas que receberam 1 aplicação de H_2O_2. Após o retorno da rega, apenas plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram maior concentração de trealose (Figura 7g).

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Aplicação de H_2O_2 não alterou o potencial água das folhas

Plantas sob condições de baixa disponibilidade hídrica normalmente apresentam como resposta fisiológica a redução do potencial hídrico nas folhas, devido ao acúmulo de solutos, de forma a manter o turgor das células e proteger estruturas subcelulares (ISHIBASHI et al., 2011; ZAHOOR et al., 2017), o que foi observado neste trabalho (Figura 1a). Entre as principais substâncias osmoticamente ativas sintetizadas pelas plantas em condições de seca estão os açúcares solúveis e aminoácidos como prolina (KAUR; ASTHIR, 2015; ZAHOOR et al., 2017). Não se detectou alteração no potencial água das folhas decorrente da aplicação de H_2O_2, durante a restrição hídrica e após o retorno da rega, embora a sua aplicação tenha modificado o acúmulo de prolina e o perfil de açúcares solúveis em tomateiro submetido à seca (Figura 6b e 7).

2.4.2 Uma aplicação de H_2O_2 favoreceu a fase fotoquímica com maior Φ_{PSII} e menores qN, *D* e *Ex*

Plantas de tomateiro submetidas à seca apresentaram redução em Φ_{PSII} (Figura 2a), resposta esperada e observada em outros estudos, como de Sperdouli; Moustakas, (2012). O estresse por seca em plantas resulta em alterações no direcionamento da energia captada pelos fotossistemas, com redução da fase fotoquímica e aumento da dissipação por calor (*D*), de forma a prevenir a formação excessiva de ERO (CAO et al., 2015). Isso ocorre especialmente pela redução da disponibilidade de CO_2 causada pelo fechamento estomático necessário para reduzir a perda de água pela transpiração, que acaba aumentando a fotorrespiração e a necessidade de extinção do excesso de energia não incorporada em moléculas orgânicas (PINHEIRO; CHAVES, 2011). No entanto, verificamos que plantas que receberam aplicação de 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior Φ_{PSII} (Figura 2b), o que estima maior eficiência na conversão da energia luminosa em agentes redutores (HAZRATI et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Isso pode ser verificado também pela redução em qN, em *D* nas plantas regadas e em *Ex* nas plantas submetidas à seca (Figura 2c,d,e), o que sugere a promoção de processos fotoquímicos em detrimento dos não fotoquímicos com a aplicação de 1 aplicação de H_2O_2.

Após o retorno da rega, Φ_{PSII} das plantas recuperadas foi semelhante ao das plantas constantemente regadas (Figura 2f), não sendo observada diferença com a aplicação de H_2O_2, o que permite dizer que a fotoinibição observada durante a restrição hídrica foi revertida. Isso também é sugerido pelo menor qN em plantas recuperadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2, e resultados similares em *D* e *Ex* nas plantas constantemente regadas e recuperadas (Figura 2g,h,i).

2.4.3 Aplicação de H_2O_2 aumentou *A* e EUA_i de plantas constantemente regadas

Em plantas regadas, 2 aplicações de H_2O_2 promoveu redução em *Gs* e *E*, sem no entanto provocar redução em *A* (Figura 3a,b,c). H_2O_2 exógeno pode exercer ação sinalizadora e alterar a movimentação estomática, conforme observado em outros estudos Jamaludin et al., (2020). Segundo Neill et al., (2008), H_2O_2 está envolvido na via que promove o fechamento estomático por condições de estresses abióticos, principalmente interagindo com ácido abscísico (ABA) e óxido nítrico (NO). Em

resposta ao déficit hídrico, a sinalização por ABA envolve ativação da produção de H_2O_2 por NADPH oxidase, que induz a produção de NO por nitrato redutase e outras enzimas, como oxido nítrico sintase, provocando acúmulo de NO em células guardas e fechamento estomático. Dessa forma, 2 aplicações de H_2O_2 podem ter ocasionado sinalização para redução de *Gs*, observado nas plantas regadas (Figura 3b).

Plantas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior *A* em relação aquelas que receberam 2 aplicações de H_2O_2, o que pode ter ocorrido devido a menor *Gs* observada nessas últimas (Figura 3c,b). O estímulo à fotossintese mediado pelo fornecimento exógeno de H_2O_2 foi verificado em estudos anteriores (JAMALUDIN et al., 2020; OZAKI et al., 2009). Esses resultados talvez encontrem explicação na indução da expressão da enzima RuBisCO, verificada em *Ficus deltoideae* (JAMALUDIN et al., 2020), ou na maior atividade de enzimas chave do ciclo de Calvin-Benson e do metabolismo de açúcares, como a sacarose fosfato sintase, responsável pela formação de trioses fosfato geradas na fotossíntese (OZAKI et al., 2009).

Após o retorno da rega, plantas constantemente regadas que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram menor *E*, enquanto aquelas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 novamente apresentaram menor *Gs* (Figura 3e,f). Como não houve diferença em *A*, as plantas que receberam aplicação de H_2O_2 revelaram maior EUA_i (Figura 3g,h). Destacamos que, entre plantas que não receberam aplicação foliar de H_2O_2, aquelas recuperadas apresentaram maior EUA_i. Como não se observou diferença entre plantas regadas ou recuperadas que receberam aplicação de H_2O_2, o presente estudo demonstrou benefícios da aplicação de H_2O_2 para melhor utilização dos recursos hídricos das plantas constantemente regadas.

2.4.4 Plantas submetidas à seca que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram menor concentração foliar de MDA e H_2O_2

O aumento da peroxidação lipídica em plantas submetidas à seca é evidenciado pelo acúmulo de MDA, o que foi observado neste trabalho (Figura 4a), sendo resultado direto da geração excessiva de ERO que acarreta danos oxidativos em membranas biológicas (HABIB et al., 2020). Como discutido anteriormente,

plantas submetidas à seca apresentam excesso de energia nos fotossistemas devido à redução na disponibilidade de CO_2, o que aumenta a necessidade de utilização de vias alternativas para extinção de energia, como o é caso da fotorrespiração. Segundo Foyer et al., (2009), a fotorrespiração é responsável pela maior geração de H_2O_2 nos tecidos fotossintéticos, assim como outras ERO potencialmente mais destrutivas são formadas naturalmente durante o fluxo de elétrons nos fotossistemas, como oxigênio singleto, radicais superóxido e hidroxila (MIYAKE, 2010). Neste trabalho, embora a seca tenha provocado aumento de ERO como H_2O_2, foi observado que plantas que receberam aplicação de H_2O_2 tiveram redução no impacto dessas moléculas na peroxidação de membranas, com menor acúmulo de MDA no tecido foliar (Figura 4b,c,a). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos que utilizaram H_2O_2 exógeno em plantas submetidas à seca (HABIB et al., 2020; IQBAL et al., 2018), o que sugere seu potencial de sinalização para aclimatação de plantas, com redução dos danos causados pelo estresse.

2.4.5 Uma aplicação de H_2O_2 proporcionou maior atividade de APX em plantas submetidas à seca

Atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD foi maior em plantas submetidas à seca que não receberam aplicação de H_2O_2, o que, junto ao maior acúmulo de MDA observado, sugere que as enzimas não foram efetivas para evitar o dano oxidativo (Figura 5a,b,c e 4a). Da mesma forma, a maior atividade de APX em plantas submetidas à seca que receberam 1 aplicação de H_2O_2 pode ter removido ERO, com menor acúmulo de MDA e H_2O_2 nessas plantas (Figura 5d e 4a,c). Segundo Miyake, (2010) APX é essencial na regulação do dreno alternativo de elétrons denominado ciclo água-água, assim como o fluxo cíclico de elétrons ao redor do fotossistema I (FSI), que ajuda a regular o transporte de elétrons para reduzir a fotoinibição. A ação da APX ocorre sobre o H_2O_2 produzido pela SOD, resultando em água e dessa forma, reduzindo o acúmulo de ERO no fotossistema (MIYAKE, 2010).

Após o retorno da raga, maior atividade de CAT foi observada nas plantas constantemente regadas ou recuperadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 (Figura

5f), enquanto apenas plantas constantemente regadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram maior atividade de APX (Figura 5h). Isso pode ser devido a maior atividade de SOD verificada nas plantas constantemente regadas (Figura 5e), exigindo maior atividade reguladora da APX sobre H_2O_2.

2.4.6 Duas aplicações de H_2O_2 em plantas submetidas à seca resultou em maior concentração de fenóis totais e menor concentração de prolina

A despeito da menor atividade das enzimas antioxidantes observada nas plantas submetidas à seca que receberam 2 aplicações de H_2O_2, foi observado maior acúmulo de compostos fenólicos totais nessas plantas (Figura 6a), possivelmente atuantes na remoção de ERO e regulação de MDA. Segundo Sánchez-Rodríguez et al., (2011), condições de estresse como déficit hídrico estimulam a produção de compostos do metabolismo especializado, como compostos fenólicos, que realizam a destoxificação de ERO, e devido suas propriedades redox, atuam como agentes redutores e doadores de hidrogênio. Em seu estudo com variedades de tomate cereja submetidas à condição de seca, os autores verificaram incremento em compostos fenólicos na cultivar Zarina, que é um material tolerante ao déficit hídrico, com menor acúmulo de MDA e H_2O_2 durante a condição de estresse.

Aumento de compostos fenólicos devido ao fornecimento exógeno de H_2O_2 também foi verificado em outras espécies, como *F. deltoideae* (JAMALUDIN et al., 2020), com a sugestão de sinalização dessa ERO sobre a expressão gênica de moléculas precursoras de compostos fenólicos. Estudos anteriores revelaram respostas do metabolismo à alterações do ambiente com sinalização por meio de moléculas de açúcares ou ERO, que induzem a produção de micro RNAs, como miR858 que atua sobre fatores de transcrição, MYB, desempenhando papel regulatório crítico na biossíntese de fenilpropanóides, precursores de compostos fenólicos, em condições de estresse (DENG; LU, 2017). No presente estudo, após retorno da rega, apenas plantas recuperadas que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram concentração de compostos fenólicos semelhante às plantas

constantemente regadas (Figura 6c), o que pode indicar efetiva sinalização para essas plantas.

Verificou-se que plantas submetidas à seca apresentaram maior acúmulo de prolina em relação as plantas regadas (Figura 6b). Aumento substancial no conteúdo de prolina em plantas expostas a estresses abióticos é uma resposta metabólica esperada, podendo representar mais de 80% dos aminoácidos livres encontrados nos tecidos vegetais, em comparação a 5% nas plantas em condições normais. Segundo Spormann et al., (2023) maior acúmulo de prolina em plantas sob estresse tem sido frequentemente relatado como sinal de maior tolerância do vegetal, no entanto essa interpretação pode se mostrar equivocada pois esse acúmulo pode ser um sinal ou resposta provocada por necessidade de combate ao estresse, já que em condições normais a síntese desse aminoácido é regulada por feedback negativo. Prolina está envolvida na estabilização de estruturas subcelulares, eliminação de ERO, tamponamento de potencial redox celular, atuando nas plantas com déficit hídrico especialmente no ajuste osmótico em conjunto com outros solutos compatíveis, como açúcares solúveis (KAUR; ASTHIR, 2015; SPERDOULI; MOUSTAKAS, 2012). Observamos neste estudo que embora plantas submetidas à seca que receberam aplicação de H_2O_2 tenham apresentado menor concentração de prolina, alteração no perfil de açúcares pode explicar a manutenção no potencial hídrico das folhas em relação as plantas que não receberam aplicação de H_2O_2. Após o retorno da rega, apenas plantas recuperadas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 apresentaram menor concentração de prolina (Figura 6d), o que sugere reversão mais rápida à seca por sinalização do H_2O_2. O catabolismo da prolina ocorre nas mitocôndrias, e está atrelado à respiração oxidativa e geração de energia. Dessa forma, o produto pode ser utilizado para retomada do crescimento (KAUR; ASTHIR, 2015).

2.4.7 Uma aplicação de H_2O_2 em plantas submetidas à seca resultou em maior concentração de arabinose, manose, glicose e frutose

Aplicação de H_2O_2 propiciou mudanças no perfil químico de açúcares solúveis, tanto em plantas submetidas à seca quanto naquelas constantemente regadas (Figura

7). Plantas submetidas à seca que receberam 1 aplicação de H_2O_2 podem ter se beneficiado pela maior concentração de açúcares redutores glicose e frutose que atuam no equilíbrio osmótico celular, assim como arabinose e manose, importantes componentes da parede celular (ŽIVANOVIĆ et al., 2020), fazendo parte de extensinas e de outras moléculas sinalizadoras como flavonoides e peptídeos (MARIETTE et al., 2021)

Živanović et al., (2020) estudando o impacto do déficit hídrico em plantas de tomate com genótipo subtipo selvagem e mutantes flacca, que não produzem ABA e portanto, não fecham seus estômatos em condições de seca, verificaram que as plantas mutantes toleram a seca aumentando o acúmulo de açúcares solúveis em suas folhas, especialmente glicose, por maior atividade de enzimas invertases ácidas e redução na translocação da sacarose para tecidos dreno. Esta condição pode ter ocorrido nas plantas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 (Figura 7d). Duas aplicações de H_2O_2 também aumentou a concentração de manose nas plantas submetidas à seca (Figura 7c). Outros autores verificaram que o acúmulo desse açúcar em plantas mutantes, promovido por modificação em gene GMP que cataliza a síntese da manose, pode ser utilizado como estratégia para promover tolerância ao estresse osmótico em plantas (HE et al., 2017). Manose em plantas pode estar envolvida na síntese de ácido ascórbico, molécula que atua como antioxidante não enzimático, capaz de atuar na destoxificação de ERO (LI et al., 2019). Como observado nesse trabalho, plantas submetidas à seca que receberam aplicação de H_2O_2 apresentaram menor acúmulo de MDA e H_2O_2 (Figura 4a,c), sugerindo a contribuição do acúmulo de manose na síntese de compostos de defesa.

Nas plantas regadas que não receberam aplicação de H_2O_2, a concentração de manose foi maior do que nas plantas submetidas à seca, o que pode estar relacionado ao menor conteúdo de açúcares redutores (Figura 7c,d,e). Plantas regadas que receberam aplicação foliar de H_2O_2 apresentaram redução na concentração de manose, ao contrário das submetidas à seca. Isso pode ser devido a menor concentração foliar de H_2O_2, que pode ter reduzido a sinalização para o acúmulo desse açúcar, promovendo inclusive a sua incorporaçao nas paredes celulares em polímeros de hemicelulose, como destacado no trabalho de Gilbert et al., (2009).

Após o retorno da rega, trealose foi maior em plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2 (Figura 7g), assim como frutose foi maior em plantas recuperadas em relação às plantas constantemente regadas (Figura 7j). Diferentemente do resultado de acúmulo de trealose verificado em plantas de tomate subtipo selvagem sob déficit hídrico (ŽIVANOVIĆ et al., 2020), nossas plantas submetidas à seca não apresentaram maior concentração de trealose durante o período de estresse, o que ocorreu após o retorno da rega nas plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2. Segundo os autores, trealose regula a degradação do amido via trealose-6-fosfato, o que permite maior acúmulo de açúcares solúveis. Outras funções reportadas da trealose em plantas submetidas ao déficit hídrico são a sua alta capacidade de retenção de água, fonte de energia para processos metabólicos e sinalização molecular para compostos de defesa (LI et al., 2019). Dessa forma, a detecção de maior concentração de trealose em plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2 pode sugerir que essas plantas ainda estavam promovendo ajustes metabólicos para total superação do estresse, embora os níveis de MDA estivessem semelhantes aos das plantas regadas (Figura 4d).

2.4.8 Maior similaridade foi observada entre plantas que não aplicação de H_2O_2 e plantas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 durante o período de restrição hídrica. O retorno da rega aproximou plantas recuperadas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 e plantas constantemente regadas que não receberam ou que receberam 2 aplicações de H_2O_2

O mapa de calor formou dois cluster distintos no período de restrição hídrica (Figura 8a), indicando maior similaridade nas respostas entre plantas regadas independente da aplicação de H_2O_2 e entre plantas submetidas à seca. Esses dois clusters principais foram subdivididos agrupando plantas que não receberam ou que receberam 2 aplicações de H_2O_2, o que permite sugerir que 1 aplicação de H_2O_2 altera de modo mais pronunciado o metabolismo do tomateiro. É interessante destacar que, entre as plantas regadas, foi observado tendência negativa (quadrados azuis) para sacarose em plantas que receberam H_2O_2, especialmente 1 aplicação de H_2O_2,

sugerindo maior exportação desse açúcar para drenos em desenvolvimento, como argumentaram Xu et al., (2018). A tendência positiva (quadrados vermelhos) em *A* e Φ_{PSII} podem confirmar essa hipótese. Apesar das plantas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 não apresentarem destaque para *A* e Φ_{PSII}, apresentaram pra EUA_i, indicando melhor aproveitamento dos recursos hídricos. As plantas regadas que não receberam aplicação de H_2O_2, por outro lado apresentaram tendência positiva para *D*, o que sugere necessidade de fotoproteção, com dissipação de parte da energia captada pelos complexos antena (CAO et al., 2015). Entre plantas submetidas à seca, destacamos aquelas que não receberam aplicação de H_2O_2 com tendência positiva para sacarose, o que segundo Živanović et al., (2020) contribui com ajuste osmótico mas sugere retenção desse açúcar na fonte e menor exportação para drenos. Nessas plantas, *Ex* também apresentou tendência positiva, o que pode ter contribuído com mais energia acumulada nos fotossistemas passível de provocar dano (WILHELM; SELMAR, 2011), confirmado pela tendência positiva para MDA.

Após retorno da rega (Figura 8b), as plantas constantemente regadas que não receberam ou receberam 2 aplicações de H_2O_2 e as plantas recuperadas que receberam 2 aplicações de H_2O_2 apresentaram maiores semelhanças e formaram um cluster (I). O cluster mais distinto está constituído pelas plantas recuperadas que não receberam aplicação de H_2O_2 (IV). Os outros dois clusters (II e III) são intermediários entre os clusters I e IV. O cluster II foi aproximado do cluster I devido a tendência positiva em EUA_i, PAF, *Gs*, prolina e H_2O_2 observados nas plantas recuperadas que receberam H_2O_2. As plantas recuperadas que não receberam aplicação foliar de H_2O_2 (cluster IV) apresentaram tendência positiva para trealose e prolina, geralmente observados em plantas sob estresse, para ajuste osmótico e sinalização para compostos de defesa (LI et al., 2019; SPORMANN et al., 2023), e H_2O_2, que pode ter sinalizado essas substâncias, enquanto o cluster III com plantas constantemente regadas que receberam 1 aplicação de H_2O_2 apresentaram tendência positiva em *A*, *E*, Φ_{PSII}, enzimas antioxidantes, sacarose e glicose, o que pode se relacionar com alta atividade metabólica e ajuste osmótico. Os resultados de similaridade obtidos com a utilização de 2 aplicações de H_2O_2 em plantas recuperadas e em plantas constantemente regadas sugere que a sinalização inicial provocada pela ERO resultou em aclimatação sistêmica adquirida.

Consideramos que aplicação foliar de H_2O_2 pode contribuir com estratégias, como aclimatação sistêmica adquirida, para enfrentamento de períodos de seca não previstas, decorrentes inclusive dos novos desafios impostos pelas mudanças climáticas, visto que plantas submetidas à seca que receberam H_2O_2 apresentaram menor dano oxidativo durante a restrição hídrica, com alterações metabólicas que resultaram em sinalização para produção de compostos relacionados a defesa vegetal, como a enzima APX, fenóis, arabinose e manose. Plantas que não foram submetidas à seca e receberam aplicação de H_2O_2 não revelaram prejuízos, apresentando inclusive maior desempenho fotoquímico e melhor eficiência do uso da água, otimizando os recursos luminoso e hídrico. Esperamos que nossos achados contribuam e despertem novas pesquisas sobre estimulação de sinalização por ERO para modificações no metabolismo de plantas com maior produtividade, aclimatação frente a situações adversas e até mesmo síntese de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

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. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39, 205–207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44, 276–287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8

Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M.F., 2004. Antioxidant Phenols in Barley (Hordeum vulgare L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. J. Agric. Food Chem. 52, 5195–5200. https://doi.org/10.1021/JF040075C

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, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cao, B., Ma, Q., Zhao, Q., Wang, L., Xu, K., 2015. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. Sci. Hortic. (Amsterdam). 194, 53–62. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.037

Choi, W.-G., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., Gilroy, S., 2017. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca 2+ , ROS and electrical signals. Plant J. 90, 698–707. https://doi.org/10.1111/tpj.13492

Czarnocka, W., Karpiński, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. Free Radic. Biol. Med. 122, 4–20. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.01.011

de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Rolim Medeiros, J.-V., Gomes-

Filho, E., 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. J. Plant Physiol. 162, 1114–1122. https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2005.01.007

Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., CZYGAN Lehrstuhlfiur Botanik BD, F.I., Pharmazeutische Biologie, L.A., 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. Plant Physiol. 84, 218–224.

Deng, Y., Lu, S., 2017. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 36, 257–290. https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852

FAOSTAT, 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations [WWW Document]. Crop. Livest. Prod. URL https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (accessed 2.5.23).

Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G., 2009. Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 455–484. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091948

Gilbert, L., Alhagdow, M., Nunes-Nesi, A., Quemener, B., Guillon, F., Bouchet, B., Faurobert, M., Gouble, B., Page, D., Garcia, V., Petit, J., Stevens, R., Causse, M., Fernie, A.R., Lahaye, M., Rothan, C., Baldet, P., 2009. GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. Plant J. 60, 499–508. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03972.x

Habib, N., Ali, Q., Ali, S., Tariq Javed, M., Haider, M.Z., Perveen, R., Shahid, M.R., Rizwan, M., Abdel-Daim, M.M., Elkelish, A., Bin-Jumah, M., 2020. Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (Triticum aestivum L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism 9, 285. https://doi.org/10.3390/plants9020285

Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S.A.M., Mokhtassi-Bidgoli, A., Nicola, S., 2016. Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of Aloe vera L. Plant Physiol. Biochem.

106, 141–148. https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.04.046

He, C., Yu, Z., Teixeira Da Silva, J.A., Zhang, J., Liu, X., Wang, X., Zhang, X., Zeng, S., Wu, K., Tan, J., Ma, G., Luo, J., Duan, J., 2017. DoGMP1 from Dendrobium officinale contributes to mannose content of water-soluble polysaccharides and plays a role in salt stress response. Sci. Rep. 7, 1–13. https://doi.org/10.1038/srep41010

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Hoagland, R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circ. Calif. Agric. Exp. Stn. 347.

IPCC, 2022. IPCC, 2022: Summary for Policymakers, in: Pörtner, H.-O., Roberts, D.C., Poloczanska, E.S., Mintenbeck, K., Tignor, M., Alegría, A., Craig, M., Langsdorf, S., Löschke, S., Möller, V., Okem, A. (Eds.), Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, US. https://doi.org/10.1017/9781009325844.001

Iqbal, H., Yaning, C., Waqas, M., Rehman, H., Shareef, M., Iqbal, S., 2018. Hydrogen peroxide application improves quinoa performance by affecting physiological and biochemical mechanisms under water-deficit conditions. J. Agron. Crop Sci. 204, 541–553. https://doi.org/10.1111/jac.12284

Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., Zheng, S.H., 2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. J. Plant Physiol. 168, 1562–1567. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003

Jamaludin, R., Mat, N., Mohd, K.S., Badaluddin, N.A., Mahmud, K., Sajili, M.H., Khandaker, M.M., 2020. Influence of exogenous hydrogen peroxide on plant physiology, leaf anatomy and rubisco gene expression of the Ficus deltoidea Jack var. deltoidea. Agronomy 10. https://doi.org/10.3390/agronomy10040497

Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities

during Rice Leaf Senescence. Plant Physiol. 57, 315–319. https://doi.org/10.1104/PP.57.2.315

Kaur, G., Asthir, B., 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. Biol. Plant. 59, 609–619. https://doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3

Li, Z., Yong, B., Cheng, B., Wu, X., Zhang, Y., Zhang, X., Peng, Y., 2019. Nitric oxide, γ-aminobutyric acid, and mannose pretreatment influence metabolic profiles in white clover under water stress. J. Integr. Plant Biol. 61, 1255–1273. https://doi.org/10.1111/jipb.12770

Mariette, A., Kang, H.S., Heazlewood, J.L., Persson, S., Ebert, B., Lampugnani, E.R., 2021. Not Just a Simple Sugar: Arabinose Metabolism and Function in Plants. Plant Cell Physiol. 62, 1791–1812. https://doi.org/10.1093/pcp/pcab087

Miyake, C., 2010. Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: Molecular mechanisms and physiological functions. Plant Cell Physiol. 51, 1951–1963. https://doi.org/10.1093/pcp/pcq173

Murchie, E.H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. J. Exp. Bot. 64, 3983–3998. https://doi.org/10.1093/jxb/ert208

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232

Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I., 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. J. Exp. Bot. 59, 165–176. https://doi.org/10.1093/jxb/erm293

Ozaki, K., Uchida, A., Takabe, Tomoko, Shinagawa, F., Tanaka, Y., Takabe, Teruhiro, Hayashi, T., Hattori, T., Rai, A.K., Takabe, Tetsuko, 2009. Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. J. Plant Physiol. 166, 569–578. https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2008.08.007

Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of

oxidative metabolism in sorghum. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 11, 137–143.

Pinheiro, C., Chaves, M.M., 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? J. Exp. Bot. 62, 869–882. https://doi.org/10.1093/jxb/erq340

Sánchez-Rodríguez, E., Moreno, D.A., Ferreres, F., Rubio-Wilhelmi, M.D.M., Ruiz, J.M., 2011. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. Phytochemistry 72, 723–729. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.011

Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. del M., Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., Ruiz, J.M., 2012. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. Plant Sci. 188–189, 89–96. https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.12.019

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R.K., Tripathi, D.K., Singh, V.P., Chauhan, D.K., Prasad, S.M., 2016. Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. Front. Plant Sci. 7, 1299. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299

Sperdouli, I., Moustakas, M., 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. J. Plant Physiol. 169, 577–585. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.015

Spormann, S., Nadais, P., Sousa, F., Pinto, M., Martins, M., Sousa, B., Fidalgo, F., Soares, C., 2023. Accumulation of Proline in Plants under Contaminated Soils — Are We on the Same Page? Antioxidants 12, 1–26.

Suksom, W., Wannachai, W., Boonchiangma, S., Chanthai, S., Srijaranai, S., 2015. Ion chromatographic analysis of monosaccharides and disaccharides in raw sugar. Chromatographia 78, 873–879. https://doi.org/10.1007/s10337-015-2865-3

Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (Lemna minor). Plant Sci. 153.

Waqas, M.A., Kaya, C., Riaz, A., Farooq, M., Nawaz, I., Wilkes, A., Li, Y., 2019. Potential Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants Induced by Thiourea. Front. Plant Sci. 10. https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01336/FULL

Wilhelm, C., Selmar, D., 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. J. Plant Physiol. 168, 79–87. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.012

Xu, Q., Chen, Siyuan, Yunjuan, R., Chen, Shaolin, Liesche, J., 2018. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. Plant Physiol. 176, 930–945. https://doi.org/10.1104/pp.17.01088

Zahoor, R., Zhao, W., Abid, M., Dong, H., Zhou, Z., 2017. Potassium application regulates nitrogen metabolism and osmotic adjustment in cotton (Gossypium hirsutum L .) functional leaf under drought stress. J. Plant Physiol. 215, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.001

Zhang, Y., Shi, Y., Gong, H. jun, Zhao, H. liang, Li, L.H., Hu, Y. hong, Wang, Y. chao, 2018. Beneficial effects of silicon on photosynthesis of tomato seedlings under water stress. J. Integr. Agric. 17, 2151–2159. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62038-6

Živanović, B., Komić, S.M., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., Jovanović, S.V., 2020. Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. Plants 9, 1–17. https://doi.org/10.3390/PLANTS9091147

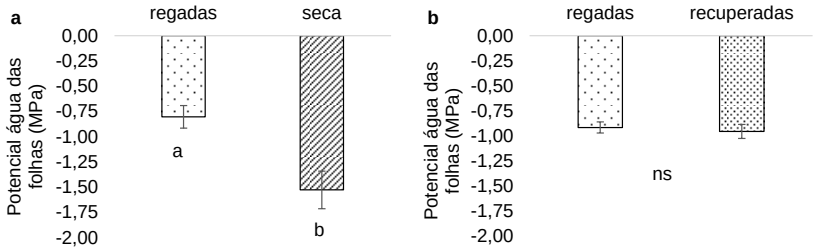

Figura 1. (a) Potencial água das folhas de plantas de tomateiro cultivadas sob regime hídrico normal (regadas) ou submetidas à seca, e (b) após retorno da rega, plantas constantemente regadas e plantas recuperadas. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam médias pelo teste Tukey (<0,05).

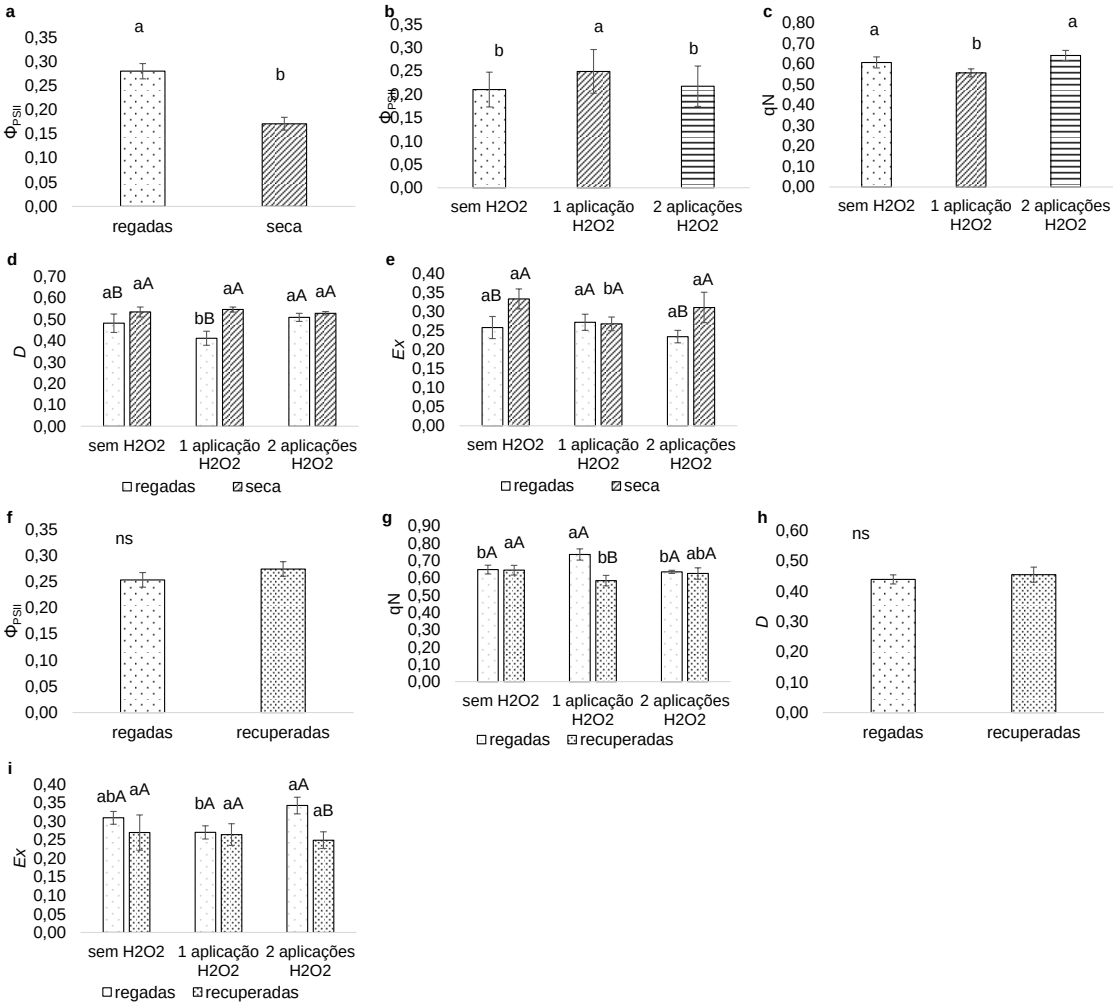

Figura 2. (a,b) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}), (c) coeficiente do quenching não fotoquímico da fluorescência (qN), (d) dissipação de calor no complexo antena (*D*) e (e) energia não dissipada e não utilizada na fase fotoquímica (*Ex*) em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (f) Φ_{PSII}, (g) qN, (h) *D* e (i) *Ex*. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

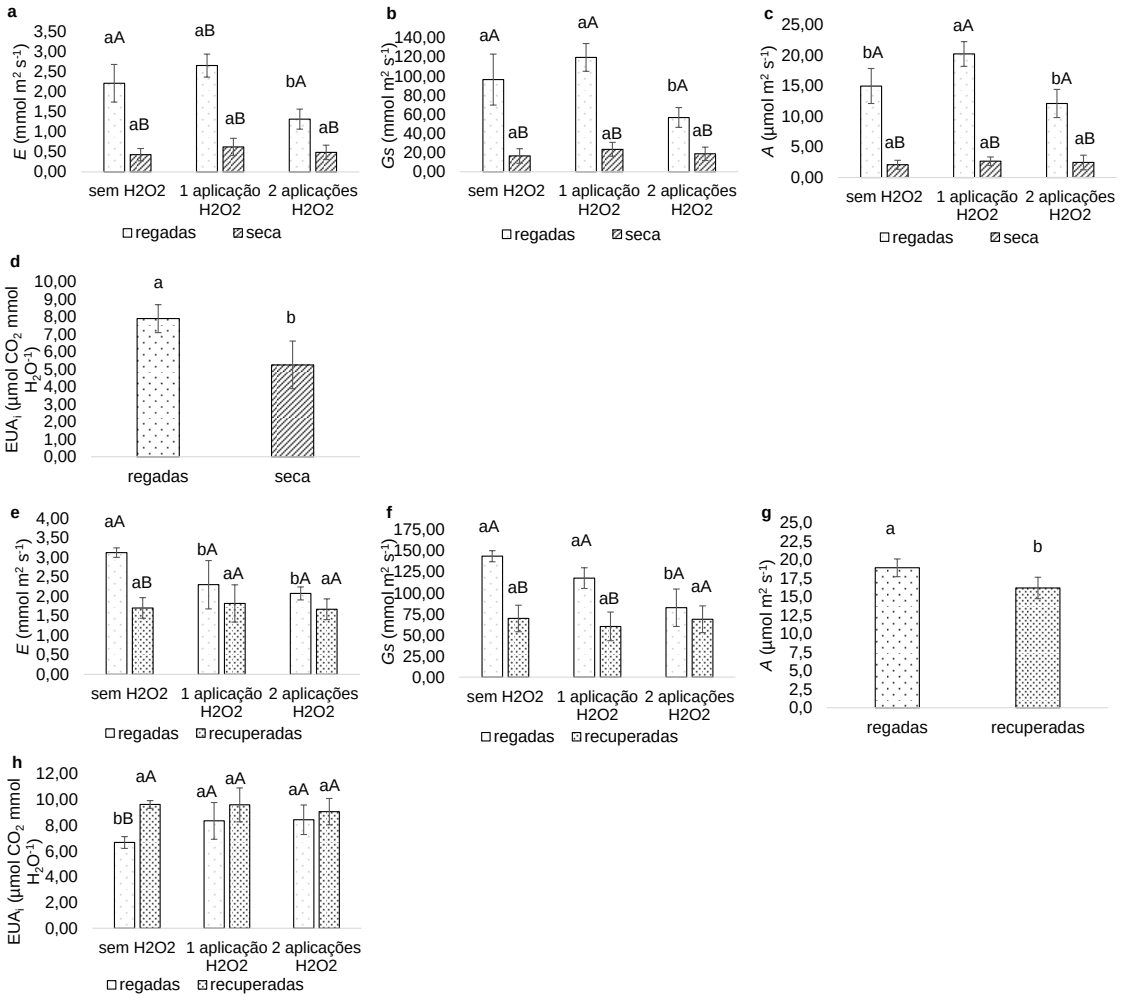

Figura 3. (a) Taxa de transpiração (*E*), (b) condutância estomática (*Gs*), (c) assimilação líquida de CO_2 (*A*) e (d) eficiência instantânea do uso de água (EUA_i) em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (e) *E*, (f) *Gs*, (g) *A* e (h) EUA_i. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

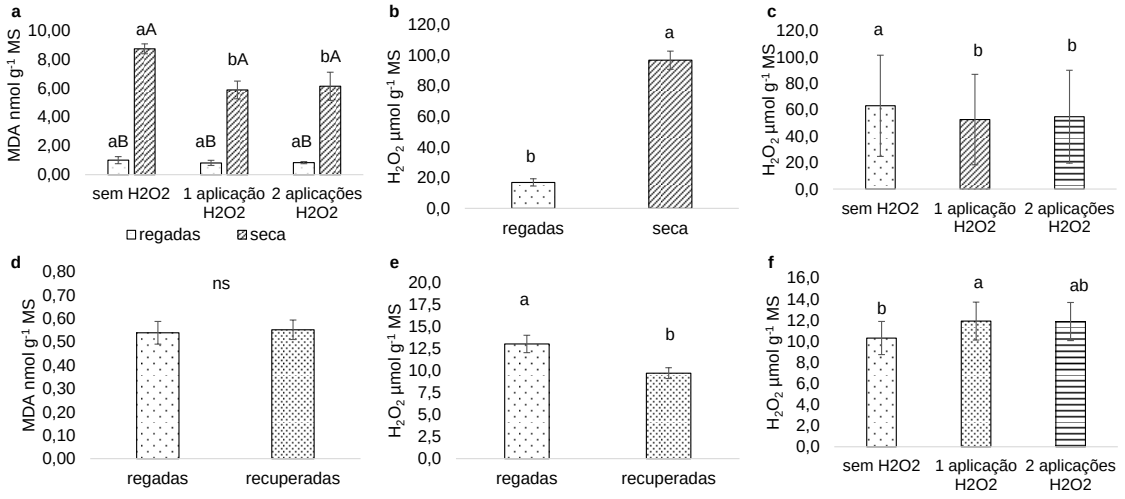

Figura 4. (a) Peroxidação lipídica (MDA) e (b,c) concentração foliar de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (d) MDA, (e,f) H_2O_2. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

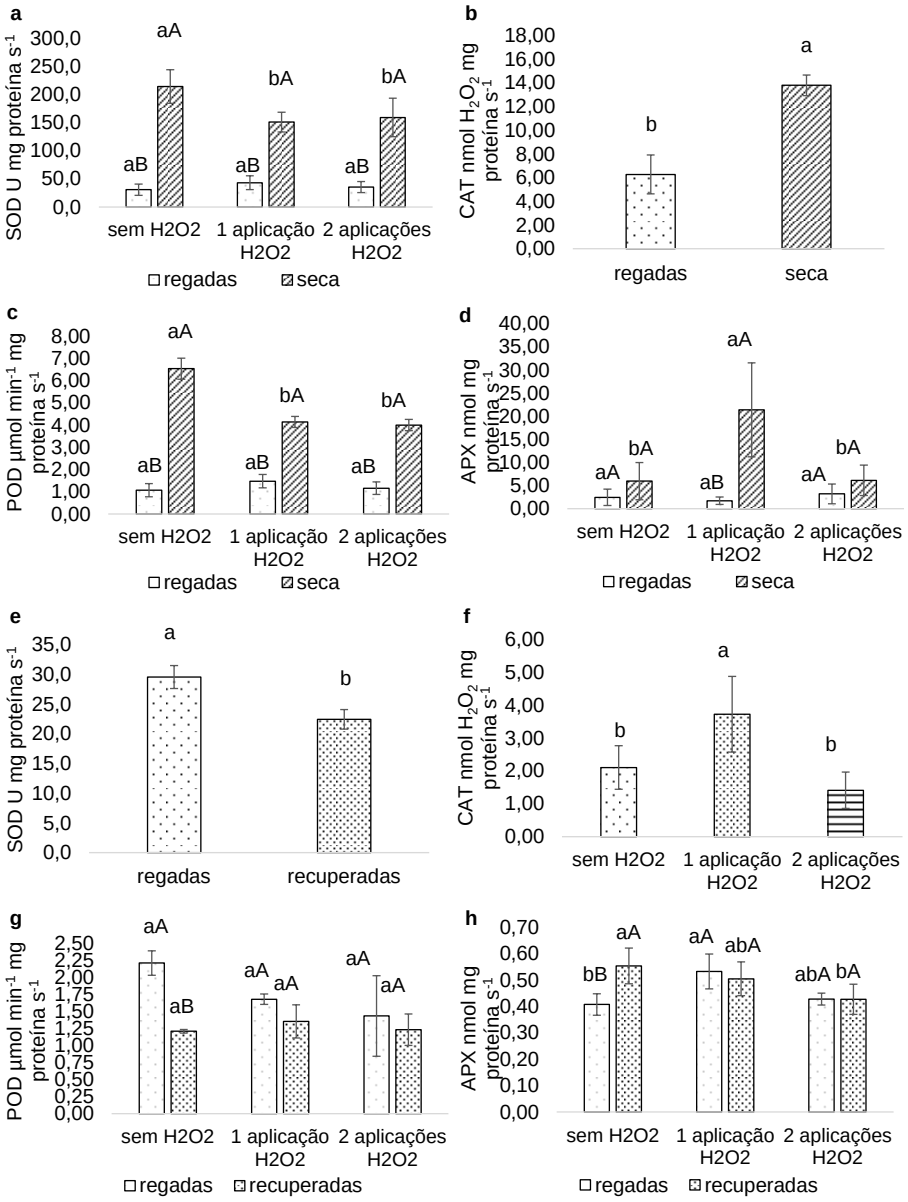

Figura 5. Atividade de enzimas antioxidantes. (a) Superóxido dismutase (SOD), (b) catalase (CAT), (c) peroxidase (POD) e (d) ascorbato peroxidase (APX) em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (e) SOD, (f) CAT, (g) POD e (h) APX. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

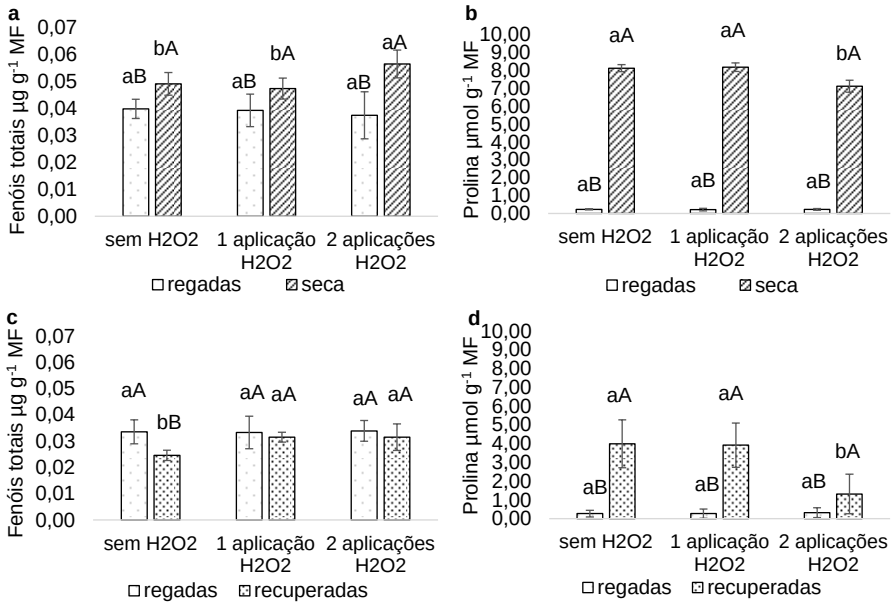

Figura 6. (a) Concentração foliar de fenóis totais e (b) concentração foliar de prolina em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (c) fenóis totais, (d) prolina. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

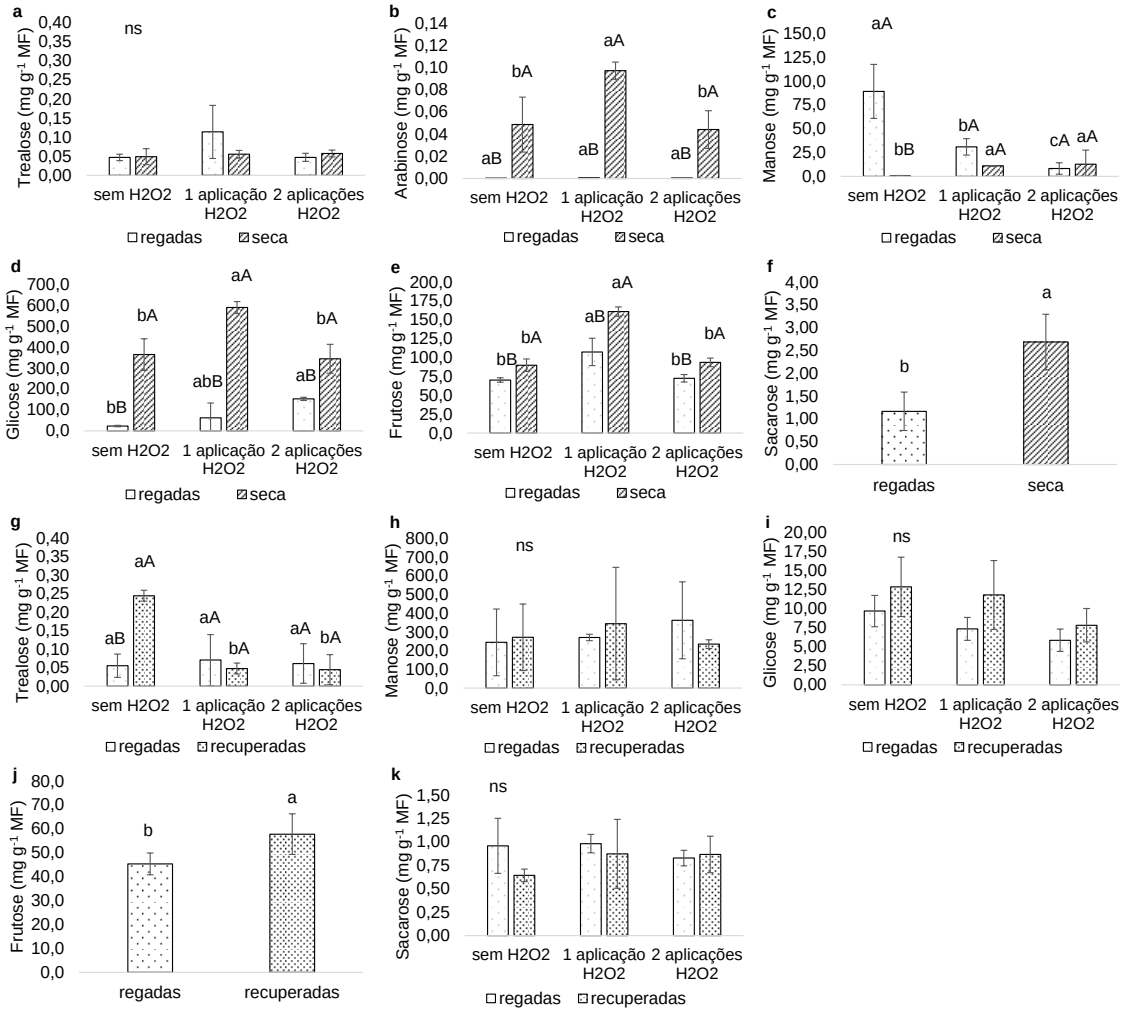

Figura 7. Concentrações foliares de açúcares solúveis. (a) Trealose, (b) arabinose, (c) manose, (d) glicose, (e) frutose e (f) sacarose em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca. Após recuperação pelo retorno da rega, (g) trealose, (h) manose, (i) glicose, (j) frutose e (k) sacarose. Valores correspondem a média ± intervalo de confiança (n=4). Letras distintas diferenciam as médias pelo teste Tukey (<0,05), minúsculas comparam aplicação foliar dentro de cada condição hídrica e maiúsculas comparam condição hídrica dentro de aplicação foliar.

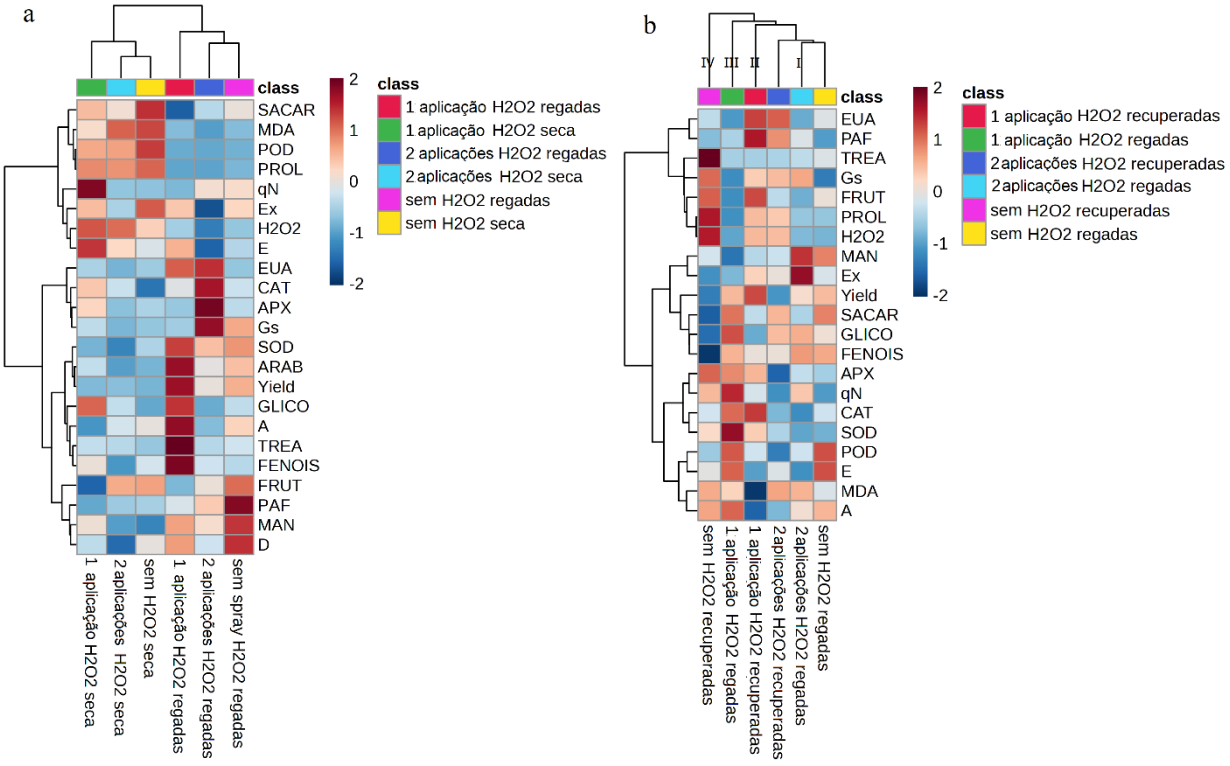

Figura 8. Mapa de calor. (a) no período de seca e (b) após recuperação pelo retorno da rega. Potencial água das folhas (PAF), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Yield), coeficiente do quenching não fotoquímico da fluorescência (qN), dissipação de calor no complexo antena (*D*), energia não dissipada e não utilizada na fase fotoquímica (*Ex*), taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*Gs*), assimilação líquida de CO_2 (*A*), eficiência instantânea do uso de água (EUA), peroxidação lipídica (MDA), concentração foliar de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), concentração foliar de fenóis totais (FENOIS), prolina (PROL), trealose (TREA), arabinose (ARAB), manose (MAN), glicose (GLICO), frutose (FRUT) e sacarose (SACAR) em plantas de tomateiro submetidas a zero, uma ou duas aplicações foliares de H_2O_2 e regadas ou submetidas à seca/recuperadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que aplicação foliar de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tomateiro foi eficaz para provocar modificações no metabolismo fotossintético e compostos relacionados à defesa vegetal. Aplicação foliar de 1 mM de H_2O_2 pode ser utilizada para aumentar o acúmulo de massa seca em tomateiro cultivado sob regime hídrico normal e acarretar aclimatação por meio da utilização de drenos alternativos para dissipação de energia não fotoquímica em plantas submetidas ao déficit hídrico, especialmente quando aplicado de modo sequencial (2x H_2O_2). Desse modo, essa prática pode ser considerada no manejo de tomateiro como forma de redução de danos perante eventos de seca ou aproveitando o melhor desempenho do sistema fotossintético.

Aplicação foliar de H_2O_2 pode ainda contribuir com estratégias, como aclimatação sistêmica adquirida, para enfrentamento de períodos de déficit hídrico não previstos, decorrentes inclusive dos novos desafios impostos pelas mudanças climáticas, visto que plantas submetidas ao déficit que receberam H_2O_2 apresentaram menor dano oxidativo durante a restrição hídrica, com alterações metabólicas que resultaram em sinalização para produção de compostos relacionados a defesa vegetal, como a enzima APX, fenóis, arabinose e manose. Plantas cultivadas sob regime hídrico normal que receberam aplicação foliar de H_2O_2 não revelaram prejuízos, apresentando inclusive maior desempenho fotoquímico e melhor eficiência do uso da água, otimizando os recursos luminoso e hídrico. Esperamos que nossos achados contribuam e despertem novas pesquisas sobre estimulação de sinalização por espécies reativas de oxigênio para modificações no metabolismo de plantas com maior produtividade, aclimatação frente a situações adversas e até mesmo síntese de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 1 dez. 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>. Acesso em: 9 set. 2019.

ATKIN, O. K. et al. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism and Respiration in Leaves of Higher Plants. p. 153–175, 2000.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, ago. 1973. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00018060>. Acesso em: 9 set. 2019.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1 nov. 1971.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, 2003.

BONOLI, M. et al. Antioxidant Phenols in Barley (Hordeum vulgare L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195–5200, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf040075c>. Acesso em: 20 maio. 2019.

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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>. Acesso em: 10 set. 2019.

CAO, B. et al. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53–62, out. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423815301114>. Acesso em: 22 ago. 2019.

CEPEA/ESALQ. Brasil Hortifruti. **Brasil Hortifruti**, p. 1–34, 2020.

CERNÝ, M. et al. Molecular Sciences Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. 2018. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/ijms>.

CHARLES, S. A.; HALLIWELL, B. Light Activation of Fructose Bisphosphatase in Isolated Spinach Chloroplasts and Deactivation by Hydrogen Peroxide: A Physiological Role for the Thioredoxin System. **Planta**, v. 151, p. 242–246, 1981.

CHOI, W.-G. et al. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca 2+ , ROS and electrical signals. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 698–707, 1 maio 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13492>. Acesso em: 5 set. 2019.

CIRILLO, V. et al. Anthocyanins Are Key Regulators of Drought Stress Tolerance in Tobacco. **Biology**, v. 10, n. 139, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology10020139>. Acesso em: 9 fev. 2022.

CZARNOCKA, W.; KARPIŃSKI, S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 4–20, 1 jul. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918300212?via%3Dihub>. Acesso em: 5 set. 2019.

DE AZEVEDO NETO, A. D. et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 10, p. 1114–1122, 14 out. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161705000726>. Acesso em: 5 set. 2019.

DEMMIG, B. et al. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. **Plant Physiology**, v. 84, p. 218–224, 1987. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/84/2/218/6082377>. Acesso em: 8 jan. 2023.

DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 4, p. 257–290, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852>.

ELSHEERY, N. I.; CAO, K.-F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiol Plant (2008)**, v. 30, p. 769–777, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11738-008-0179-x.pdf>. Acesso em: 8 nov. 2017.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 5 fev. 2023.

FOYER, C. H. et al. Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 455–484, 2009.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, n. May, p. 134–142, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>.

GARCIA, I. S. et al. Changes in soluble carbohydrates during storage of Caesalpinia echinata LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2 B, p. 739–745, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjb/a/MbJ5GwcKT8VpQTFTsnMXsHF/?lang=en>. Acesso em: 14 fev. 2022.

GILBERT, L. et al. GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. **Plant Journal**, v. 60, n. 3, p. 499–508, 2009.

GILROY, S. et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in plant science**, v. 19, n. 10, p. 623–30, 1 out. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088679>. Acesso em: 10 set. 2019.

HABIB, N. et al. Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (Triticum aestivum L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. v. 9, p. 285, 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/plants>. Acesso em: 6 jan. 2022.

HATZIG, S. et al. Early osmotic adjustment responses in drought-resistant and drought-sensitive oilseed rape Sarah. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 8, p. 797–809, 2014.

HAZRATI, S. et al. Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of Aloe vera L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 141–148, 1 set. 2016.

HE, C. et al. DoGMP1 from Dendrobium officinale contributes to mannose content of water-soluble polysaccharides and plays a role in salt stress response. **Scientific Reports**, v. 7, n. June 2016, p. 1–13, 2017.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1 abr. 1968. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986168906541>. Acesso em: 9 set. 2019.

HOAGLAND, R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>. Acesso em: 10 set. 2019.

HSU, P.-K. et al. Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. **The Plant Journal**, v. 105, p. 307–321, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tpj.15067>. Acesso em: 16 maio. 2023.

IPCC. IPCC, 2022: Summary for Policymakers. In: PÖRTNER, H.-O. et al. (Ed.). **Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, UK and New York, NY, US: Cambridge University Press, 2022.

IQBAL, H. et al. Hydrogen peroxide application improves quinoa performance by affecting physiological and biochemical mechanisms under water-deficit conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 204, n. 6, p. 541–553, 2018.

ISHIBASHI, Y. et al. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 13, p. 1562–1567, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003>.

ISMAIL, S. Z. et al. Effects of Hydrogen Peroxide on Growth, Development and Quality of Fruits: A Review. **Journal of Agronomy**, v. 14, n. 4, p. 331–336, 2015.

JAMALUDIN, R. et al. Influence of exogenous hydrogen peroxide on plant physiology, leaf anatomy and rubisco gene expression of the Ficus deltoidea Jack var. deltoidea. **Agronomy**, v. 10, n. 4, 2020.

JEANDET, P. et al. The Role of Sugars in Plant Responses to Stress and Their Regulatory Function during Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, 2022.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1 fev. 1976.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **BIOLOGIA PLANTARUM**, v. 59, n. 4, p. 609–619, 2015.

KHAN, T. A.; YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q. Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 56, n. 4, p. 1237–1248, 2018.

LI, Z. et al. Nitric oxide, γ-aminobutyric acid, and mannose pretreatment influence metabolic profiles in white clover under water stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 61, n. 12, p. 1255–1273, 2019.

LIMA NETO, M. C. et al. Cyclic electron flow, NPQ and photorespiration are crucial for the establishment of young plants of Ricinus communis and Jatropha curcas exposed to drought. **Plant Biology**, v. 19, n. 4, p. 650–659, 2017.

MARIETTE, A. et al. Not Just a Simple Sugar: Arabinose Metabolism and Function in Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 62, n. 12, p. 1791–1812, 2021.

MARTINAZZO, E. G. et al. Análise de crescimento e partição de assimilados em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom submetidas ao nitrogênio e piraclostrobina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3001, 21 out. 2015. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/16813>. Acesso em: 23 ago. 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 9 set. 2019.

MIYAKE, C. Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: Molecular mechanisms and physiological functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 12, p. 1951–1963, 2010.

MORRIS, D. L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, v. 107, n. 2775, p. 254–255, 5 mar. 1948. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.107.2775.254>. Acesso em: 14 fev. 2022.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1 ago. 1981. Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article/22/5/867/1835201/Hydrogen-Peroxide-is-Scavenged-by>. Acesso em: 20 maio. 2019.

NEILL, S. et al. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 165–176, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/59/2/165/535495>.

NOGUCHI, K.; YOSHIDA, K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. **Mitochondrion**, v. 8, p. 87–99, 2008. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/mito>. Acesso em: 6 fev. 2022.

NURNAEIMAH, N. et al. The Effects of Hydrogen Peroxide on Plant Growth, Mineral Accumulation, as Well as Biological and Chemical Properties of Ficus deltoidea. **Agronomy**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2020.

OZAKI, K. et al. Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 6, p. 569–578, 1 abr. 2009.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA - CNPGL, 1996.

PATANÈ, C. Leaf Area Index, Leaf Transpiration and Stomatal Conductance as

Affected by Soil Water Deficit and VPD in Processing Tomato in Semi Arid Mediterranean Climate. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 3, p. 165–176, 1 jun. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-037X.2010.00454.x>. Acesso em: 8 set. 2019.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologoia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999. Disponível em: <http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/pdfs/v11n3p137.pdf>.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869–882, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/62/3/869/478813>.

QURESHI, M. K. et al. Hydrogen peroxide-induced stress acclimation in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 2, p. 1–16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04156-x>.

RASHID, N. et al. Exogenous Application of Biostimulants and Synthetic Growth Promoters Improved the Productivity and Grain Quality of Quinoa Linked with Enhanced Photosynthetic Pigments and Metabolomics. **Agronomy**, v. 11, n. 2302, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy11112302>.

SALAZAR, C.; HERNANDEZ, C.; PINO, M. T. Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response. **Chilean journal of agricultural research**, v. 75, p. 71–79, ago. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-58392015000300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 set. 2019.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 723–729, 2011.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. **Plant Science**, v. 188–189, p. 89–96, 1 jun. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945211003712?via%3Dihub>. Acesso em: 8 set. 2019.

SCHROEDER, J. I. et al. Guard cell signal transduction. **Annual Review of Plant**

Physiology and Plant Molecular Biology, v. 52, n. 1, p. 627–658, 28 jun. 2001. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.52.1.627>. Acesso em: 8 set. 2019.

SHARKEY, T. D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 73, n. 1, p. 147–152, 1 maio 1988. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09205.x>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SHARKEY, T. D. et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1035–1040, 2007.

SHARKEY, T. D. Is triose phosphate utilization important for understanding photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 20, p. 5521–5525, 2019.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, p. 337–354, 2002. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/rse>. Acesso em: 15 fev. 2022.

SINGH, R. et al. Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1299, 27 set. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729914>. Acesso em: 2 set. 2019.

SPERDOULI, I.; MOUSTAKAS, M. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 577–585, 2012.

SPORMANN, S. et al. Accumulation of Proline in Plants under Contaminated Soils — Are We on the Same Page? **Antioxidants**, v. 12, n. 666, p. 1–26, 2023.

SUKSOM, W. et al. Ion chromatographic analysis of monosaccharides and disaccharides in raw sugar. **Chromatographia**, v. 78, n. 13, p. 873–879, 2015.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (Lemna minor). **Plant Science**, v. 153, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/plantsci>. Acesso em: 14 fev. 2022.

VASSEY, T. L. et al. Water stress, carbon dioxide, and light effects on sucrosephosphate synthase activity in Phaseolus vulgaris. **Physiologia Plantarum**, v. 81, n. 1, p. 37–44, 1991.

WAQAS, M. A. et al. Potential Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants Induced by Thiourea. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 29 out. 2019.

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 79–87, 2011.

XU, Q. et al. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. **Plant Physiology**, v. 176, n. 1, p. 930–945, 2018.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **Biochem. J**, v. 57, n. 3, p. 508–514, 1954.

ZAHOOR, R. et al. Potassium application regulates nitrogen metabolism and osmotic adjustment in cotton (Gossypium hirsutum L .) functional leaf under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 215, n. February, p. 30–38, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.001>.

ZHANG, Y. et al. Beneficial effects of silicon on photosynthesis of tomato seedlings under water stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2151–2159, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62038-6>.

ŽIVANOVIĆ, B. et al. Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1–17, 1 set. 2020.